

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Orgánica I



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de sondas para el estudio de los receptores acoplados a
proteína G: aplicación al receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana María Gamo Albero

Directoras

María Luz López Rodríguez
Bellinda Benhamú Salama

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Orgánica I



**DESARROLLO DE SONDAS PARA EL ESTUDIO DE LOS RECEPTORES
ACOPLADOS A PROTEÍNA G: APLICACIÓN AL RECEPTOR
SEROTONINÉRGICO 5-HT_{1A}**

Memoria que para optar al

TÍTULO DE DOCTOR

Presenta

Ana María Gamo Albero

Directoras:

Dra. María Luz López Rodríguez

Dra. Bellinda Benhamú Salama

Dra. María del Mar Martín-Fontecha Corrales

MADRID, 2014

El presente trabajo ha sido realizado en el laboratorio de Química Médica dirigido por la **Dra. María Luz López Rodríguez** en el Departamento de Química Orgánica I de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la supervisión de la **Dra. Bellinda Benhamú Salama** y de la **Dra. María del Mar Martín-Fontecha Corrales** a quienes deseo expresar mi más profundo agradecimiento por su acogida en este grupo de investigación, por sus continuas enseñanzas a lo largo de todo este tiempo, y muy especialmente, por todo el ánimo, apoyo y confianza depositada en este proyecto.

Asimismo, quiero expresar mi agradecimiento:

Al Dr. Juan Antonio López del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (Madrid) por llevar a cabo el análisis de las muestras por espectrometría de masas. Al Dr. José Antonio Ramos y al Dr. Javier Fernández, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, en cuyo laboratorio he llevado a cabo los experimentos de desplazamiento de radioligando. A la Dra. Carmen Guaza del Grupo de Inmunología del Instituto Cajal (CSIC, Madrid) por su acogida en el laboratorio, sus enseñanzas en inmunocitoquímica y por proporcionarme los cultivos de neuronas.

A mis compañeros de laboratorio, a Silvia, Dulce, Nono y Carlos, que me han enseñado tanto, a Marga, por su infinita paciencia, a los que ya estaban cuando llegué y que han contribuido a crear los lazos tan importantes en el funcionamiento de este grupo, Henar, Ángel, Tania, José, Rocío, Lidia, Inés y Moisés, a los que llegaron después y han sabido mantener el espíritu de compañerismo y de trabajo en equipo, Marta, Débora, Ainoa, Javi, Paco, Álvaro, Gloria y Nagore, sin olvidarme de la inestimable ayuda de Jorge, Carolina y Dani.

Al Instituto de Química Médica (CSIC, Madrid), en particular al Grupo de Nucleósidos, a María José, Sonsoles y María Jesús por su flexibilidad y apoyo y a mis nuevos compañeros de vitrina con quienes es tan fácil organizar el trabajo común.

A mis padres, a mis hermanos y a Javi. Sin su apoyo jamás habría comenzado, ni mucho menos acabado, este trabajo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	3
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
2.1. Sondas para la visualización del receptor 5-HT _{1A}	11
2.1.1. Diseño	11
2.1.2. Síntesis	13
2.1.3. Afinidad por el receptor 5-HT _{1A}	18
2.1.4. Propiedades fluorescentes	20
2.1.5. Visualización	21
2.2. Sondas para el estudio del estado de oligomerización del receptor 5-HT _{1A}	24
2.2.1. Diseño	26
2.2.2. Síntesis y afinidad por el receptor 5-HT _{1A}	26
2.3. Sondas para la identificación de <i>off-targets</i> de ligandos del receptor 5-HT _{1A}	27
2.3.1. Diseño de sondas duales	28
2.3.2. Síntesis	29
2.3.3. Afinidad y selectividad por el receptor 5-HT _{1A}	33
2.3.4. Detección de proteínas de membranas celulares en gel de poliacrilamida	34
2.3.5. Identificación del perfil de proteínas marcadas mediante espectrometría de masas	39
2.3.6. Validación de las proteínas identificadas. Nuevas dianas terapéuticas	41
3. PARTE EXPERIMENTAL	47
3.1. Síntesis	47
3.1.1. Procedimientos generales	49
3.1.2. Síntesis de tetrahidro-1 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]imidazol-1,3(2 <i>H</i>)-diona, 23	53
3.1.3. 2-(4-Bromobutil)tetrahidro-1 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]imidazol-1,3(2 <i>H</i>)-diona, 24	54
3.1.4. 1-(1-Naftil)piperazina, 25	54
3.1.5. 2-(1-Naftil)etanamina, 26	54
3.1.6. Síntesis de 2-fenoxietanamina, 27	55
3.1.7. Compuestos no marcados 1, 2	56

3.1.8. Compuestos no marcados 3, 4	57
3.1.9. Síntesis de 5-(dimetilamino)-1-naftilsulfonilpiperazina, 28	58
3.1.10. Ácidos bromonaftalenosulfónicos, 32-34	58
3.1.11. <i>N,N</i> -Dimetilaminonaftalenosulfonamidas, 35-37	59
3.1.12. Piperazinilsulfonamidas, 29-31	61
3.1.13. Compuestos marcados con fluoróforos derivados de naftalenosulfonamidas, 5-8	62
3.1.14. 7a-(ω-Bromoalquil)biciclohidantoínas 46-49	65
3.1.15. 7a-(ω-Azidoalquil)biciclohidantoínas 50-53	67
3.1.16. 7a-(ω-Aminoalquil)biciclohidantoínas 38-41	69
3.1.17. 7a-(ω-Bromoalquil)- <i>N</i> -tritolbiciclohidantoínas 54, 73	71
3.1.18. 7a-(ω-Azidoalquil)biciclohidantoínas 55, 74	73
3.1.19. <i>N</i> -(4-Bromobutil)biciclohidantoínas 56, 70	75
3.1.20. Aminoazidas 57, 58	76
3.1.21. Aminas <i>N</i> -Boc protegidas 59, 60	77
3.1.22. 7a-(ω-Aminoalquil)biciclohidantoínas 42, 43	78
3.1.23. Compuestos marcados con dansilo, lisamina o NBD 9-16	79
3.1.24. Compuestos marcados con biotina 17-20	86
3.1.25. Compuestos marcados con alquino 21, 22	91
3.1.26. Piperazinilbenzofenonas 68, 69	92
3.1.27. Derivados de benzofenona 66, 67, 71, 85	93
3.1.28. 7a-(ω-Aminoalquil)biciclohidantoínas 72, 86	96
3.1.29. <i>N</i> -{7-[2-{4-[4-(3-Benzoilfenil)piperazin-1-il]butil}-1,3-dioxotetrahidro-1 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]imidazol-7a(5 <i>H</i>)-il]heptil}biotinamida, 61	97
3.1.30. (+)- <i>N</i> -[4-(4-Aminobenzoil)fenil]biotinamida, 77	98
3.1.31. (+)-3-Oxo-3-({4-[4-(biotinilamino)benzoil]fenil}amino)propanoato de etilo, 78	98
3.1.32. Síntesis de ácido (+)-3-oxo-3-({4-[4-(biotinilamino)benzoil]-fenil}amino)propanoico, 75	99

3.1.33. Síntesis de (+)-4-benzoil- <i>N</i> -[(9 <i>H</i> -fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]- <i>L</i> -fenilalaninato de metilo, 79	99
3.1.34. (+)-4-Benzoil- <i>L</i> -fenilalaninato de metilo, 80	100
3.1.35. (+)-4-Benzoil- <i>N</i> -biotinil- <i>L</i> -fenilalaninato de metilo, 81	101
3.1.36. (+)-4-Benzoil- <i>N</i> -biotinil- <i>L</i> -fenilalanina, 76	101
3.1.37. Compuestos marcados con benzofenona y biotina 62-65	102
3.1.38. <i>N</i> -{4-[2-{4-[4-(3-Benzoilfenil)piperazin-1-il]butil}-1,3-dioxotetrahidro-1 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]imidazol-7 <i>a</i> (5 <i>H</i>)-il]butil}-lisaminamida, 82	106
3.1.39. (-)-4-Benzoil- <i>N</i> -[(9 <i>H</i> -fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]- <i>N</i> -{4-[2-{4-[4-(1-naftil)piperazin-1-il]butil}-1,3-dioxotetrahidro-1 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]imidazol-7 <i>a</i> (5 <i>H</i>)-il]butil}- <i>L</i> -fenilalaninamida, 87	106
3.1.40. (-)-4-Benzoil- <i>N</i> -{4-[2-{4-[4-(1-naftil)piperazin-1-il]butil}-1,3-dioxotetrahidro-1 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]imidazol-7 <i>a</i> (5 <i>H</i>)-il]butil}- <i>L</i> -fenilalaninamida, 88	107
3.1.41. (-)-4-Benzoil- <i>N</i> -lisaminil- <i>N</i> -{4-[2-{4-[4-(1-naftil)piperazin-1-il]butil}-1,3-dioxotetrahidro-1 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]imidazol-7 <i>a</i> (5 <i>H</i>)-il]butil}- <i>L</i> -fenilalaninamida, 83	108
3.1.42. Compuesto marcado con lisamina y alquino, 84	109
3.1.43. Síntesis de TriN_3	110
3.2. Análisis elemental de los compuestos 1-22, 61-67, 82-84	112
3.3. Ensayos de desplazamiento de radioligando	113
3.4. Medida de las propiedades fluorescentes	115
3.5. Experimentos de visualización celular	115
3.5.1. Visualización en células CHO transfectadas	115
3.5.2. Visualización en neuronas	116
3.6. Experimentos de proteómica	117
3.6.1. Marcaje de proteínas de membranas celulares en gel de poliacrilamida	117
3.6.2. Determinación del perfil de proteínas unidas a los ligandos mediante espectrometría de masas	118
4. CONCLUSIONES	123
5. BIBLIOGRAFÍA	127
6. SUMMARY	139

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Se han utilizado las abreviaturas y acrónimos recomendados por la *American Chemical Society* para el área de química orgánica, revisadas en las revistas *Journal of Organic Chemistry* (<http://pubs.acs.org/page/joceah/submission/authors.html>) y *Journal of Medicinal Chemistry* (http://pubs.acs.org/paragonplus/submission/jmcmr/jmcmr_abbreviations.pdf), empleándose además los indicados a continuación.

a	Ancho
ABPP	Proteómica basada en la actividad (<i>activity-based protein profiling</i>)
ABP	Sonda basada en actividad (<i>activity-based probe</i>)
ap	Aparente
ARN	Ácido ribonucleico
CFP	Proteína fluorescente azul (<i>cyan fluorescent protein</i>)
BINAP	(±)-2,2'-Bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo
CI	Concentración inhibitoria
c.c.f.	Cromatografía en capa fina
CAI	Centro de asistencia a la investigación
Ds	Dansilo
em	Emisión
EM	Espectrometría de masas
ex	Excitación
5-HT	5-Hidroxitriptamina
I	Intensidad
K_D	Constante de disociación
NBD	7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-ilo
OH-DPAT	8-Hidroxi- <i>N,N</i> -dipropilaminotetralina
P.f.	Punto de fusión
RET	Transferencia de energía por resonancia (<i>resonance energy transfer</i>)
Rto	Rendimiento
RMN	Resonancia magnética nuclear
S.D.	Subunidad dual
S.M.	Subunidad de marcaje
SNC	Sistema nervioso central

Abreviaturas y acrónimos

t.a.	Temperatura ambiente
TBTA	Tris[(1-bencil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil]amina
TM	Dominio transmembrana
u.a.	Unidad arbitraria
UCM	Universidad Complutense de Madrid
YFP	Proteína fluorescente amarilla (<i>yellow fluorescent protein</i>)

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los receptores acoplados a proteína G (*G protein-coupled receptor*, GPCR) constituyen la familia más numerosa dentro de los receptores de la membrana celular. En el genoma humano existen alrededor de 800 genes que codifican para GPCRs y representan un 2% del mismo.¹ No hay duda de la importancia que tienen estas proteínas desde el punto de vista de la química médica, si tenemos en cuenta que el mecanismo de acción del 30% de los fármacos que hay actualmente en el mercado se basa en la regulación de un GPCR y que son dianas terapéuticas implicadas en patologías tan diversas como cáncer, disfunción cardíaca, diabetes, desórdenes del sistema nervioso central (SNC), obesidad, inflamación y dolor.^{2,3} La relevancia que adquiere en la actualidad el estudio de los GPCRs queda avalada por la concesión del Premio Nobel de Química de 2012 a los científicos estadounidenses Robert Lefkowitz y Brian Kobilka por sus estudios sobre estos receptores.^{4,5}

Los GPCRs también se denominan receptores de siete dominios transmembrana (7-TM) ya que tienen una estructura común de siete hélices α que atraviesan la membrana plasmática, conectadas entre sí por tres bucles intracelulares y tres extracelulares (Figura 1). Los dominios transmembrana presentan un mayor grado de conservación en su secuencia, mientras que las mayores diferencias estructurales se encuentran en los dominios intracelulares y extracelulares, tanto en tamaño como en complejidad.⁶ Se trata de proteínas de enorme interés fisiológico, ya que juegan un papel crítico en la comunicación celular. Los GPCRs son activados por una gran variedad de ligandos tanto endógenos como exógenos, entre los que se incluyen hormonas, neurotransmisores, iones y aminoácidos.⁷ En el modelo clásico de la señalización a través de GPCRs, tras la unión de un ligando en la parte extracelular del receptor, se producen cambios conformacionales en el mismo que permiten la unión y activación de una proteína G (*GTP-binding protein*) heterotrimérica. Las proteínas G están

formadas por una subunidad G_α y una subunidad dimérica $G_{\beta\gamma}$. La proteína G activada modula efectores enzimáticos o canales iónicos, lo cual tiene como consecuencia el aumento o la disminución de la concentración de un segundo mensajero en el interior de la célula, para así inducir finalmente la respuesta en la misma.⁸

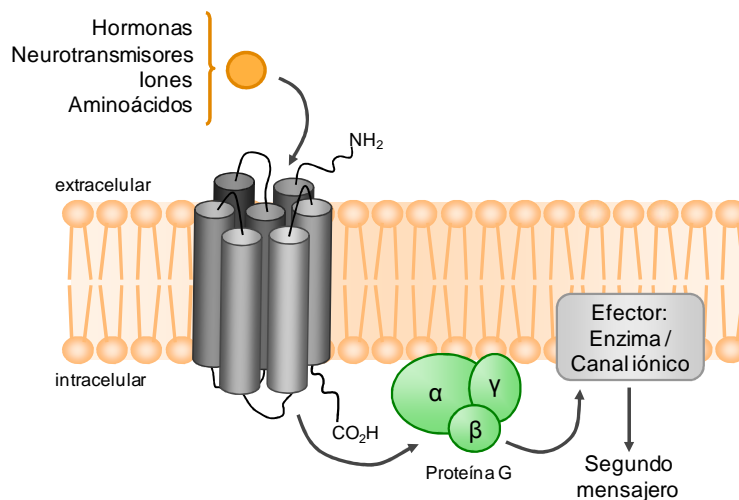


Figura 1. Comunicación celular mediada por GPCRs.

Sin embargo, el paradigma relativamente sencillo del ligando que se une al GPCR y activa la proteína G correspondiente se ha ido complicando progresivamente en los últimos años.^{2,9} El descubrimiento de vías alternativas de señalización (como las β -arrestinas y quinasas) puede explicarse teniendo en cuenta las diferentes localizaciones subcelulares de los receptores¹⁰⁻¹² y la existencia de varias conformaciones activas que pueden ser estabilizadas de forma selectiva por distintos ligandos (*biased ligands*).¹³⁻¹⁹ También existen proteínas que forman complejos macromoleculares con los GPCRs (*scaffold proteins*) modificando su señalización y efectos,^{7,20} y ligandos alostéricos, que aumentan o disminuyen la intensidad de la señal del ligando endógeno.²¹⁻²⁴ Asimismo, la formación de homo- o hetero-oligómeros que modulan la funcionalidad de los GPCRs contribuye a la complejidad de la comunicación celular mediada por estos receptores.²⁵⁻³¹

En la actualidad, solo el 20% de los GPCRs están siendo explotados como dianas terapéuticas y se estima que aproximadamente un tercio son receptores huérfanos, de los que no se conoce su ligando endógeno ni su función fisiológica.³² Por tanto existe la necesidad de estudiar estas proteínas en sistemas biológicos nativos y en último término en experimentos *in vivo*, así como de evaluar su función biológica y su implicación en diversos procesos fisiopatológicos. En este sentido, es fundamental visualizar GPCRs en sistemas biológicos reales para obtener información acerca de su densidad, distribución y localización subcelular y poder comparar patrones de expresión en sistemas fisiológicos y patológicos. Además es muy

interesante abordar el estudio de la oligomerización de GPCRs en sistemas nativos y comprender el papel que desempeña en la regulación de estos receptores. Hasta el momento se han desarrollado diversas metodologías para el estudio de los GPCRs que incluyen, entre otras, el empleo de radioligandos,³³ el desarrollo de anticuerpos selectivos,³⁴ la expresión de receptores fusionados a proteínas autofluorescentes como por ejemplo la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*, GFP)³⁵⁻³⁷ y la cristalización de proteínas para obtener la estructura tridimensional por difracción de rayos X.^{3,38} Sin embargo estas técnicas no pueden aplicarse a sistemas nativos o *in vivo*, sino que requieren el empleo de sistemas biológicos modificados y simplificados lo que en muchos casos conlleva la obtención de información errónea del sistema objeto de estudio.

Por otro lado, desde el punto de vista de la química médica es necesario ampliar el grado de conocimiento acerca del mecanismo de acción de los fármacos dirigidos a GPCRs. Tradicionalmente, se ha buscado el desarrollo de ligandos altamente selectivos para limitar los efectos secundarios asociados a la interacción de estos con otras proteínas (*off-targets*).³⁹ Sin embargo, en muchas ocasiones, especialmente en el SNC, fármacos dirigidos a GPCRs que no son selectivos han demostrado mejor eficacia clínica.^{40,41} Conocer los *off-targets* de un ligando puede explicar sus aplicaciones terapéuticas, efectos secundarios y aportar información sobre el mecanismo de acción de dicho fármaco. De hecho, actualmente se invierte un elevado esfuerzo en realizar grandes cribados de selectividad en las primeras etapas de optimización de un candidato a fármaco, aunque esta aproximación normalmente está limitada a proteínas que pertenecen a la misma familia o que tienen una elevada similitud de secuencia con la diana original. Además, se han realizado avances en bioinformática y se han desarrollado herramientas computacionales para predecir e identificar estas interacciones.^{42,43} Sin embargo, aún no existe ningún método experimental que nos permita obtener de forma eficaz el panel completo de proteínas con las que interacciona un ligando dirigido a un GPCR.

En este contexto, las técnicas clásicas no permiten obtener toda la información necesaria y menos aún en sistemas nativos, lo que pone de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevas técnicas que nos permitan obtener un mayor grado de información en sistemas con relevancia fisiológica. Con este objetivo, hemos propuesto el desarrollo de una nueva metodología que consiste en utilizar sondas moleculares especialmente diseñadas para interaccionar con GPCRs. Como punto de partida nos hemos inspirado en la proteómica funcional o proteómica basada en la actividad (*activity-based protein profiling*, ABPP).⁴⁴ Esta técnica consiste en el empleo de sondas (*activity-based probes*, ABP) que reaccionan con determinadas familias de enzimas en función de su estado de actividad y que está aportando un gran volumen de información en este campo.^{45,46} Su ventaja principal reside en la posibilidad de monitorizar directamente la actividad enzimática en lugar de que el estudio esté condicionado por la abundancia de ARN mensajero o de proteína.

Las unidades básicas de una sonda de actividad son un grupo reactivo y una subunidad de marcaje (S. M.) que permita la visualización, detección o captura de la proteína de interés (Figura 2).^{47,48} El grupo reactivo generalmente es un electrófilo que se une de forma covalente a un nucleófilo del centro activo de la enzima. La subunidad de marcaje puede ser un agente de visualización como un fluoróforo, un fragmento de biotina o un grupo bioortogonal de pequeño tamaño que permite introducir posteriormente el marcador mediante química clic. Estas subunidades están separadas por un espaciador que suele ser una cadena hidrocarbonada flexible que, además de minimizar los impedimentos estéricos que puedan venir ocasionados por subunidades de marcaje demasiado voluminosas, puede servir para modular propiedades de la sonda, tales como la lipofilia o la solubilidad, mediante la incorporación de heteroátomos en la cadena.⁴⁷ Los distintos tipos de subunidades de marcaje presentan diferentes ventajas e inconvenientes y su elección debe hacerse cuidadosamente atendiendo a las necesidades del experimento, la naturaleza del grupo reactivo y la proteína objeto de estudio. Con la sonda adecuada se pueden analizar muestras biológicas de gran complejidad utilizando diversas técnicas analíticas.

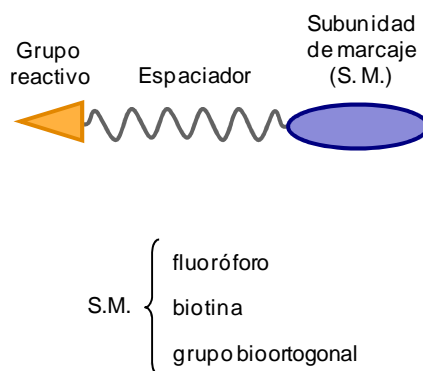


Figura 2. Esquema de una sonda de actividad.

Existen numerosos fluoróforos que pueden ser utilizados como subunidad de marcaje en experimentos de imagen en sistemas biológicos.⁴⁹ Las principales ventajas del empleo de subunidades fluorescentes es que estas pueden presentar una gran variedad de colores, suelen tener un tamaño relativamente pequeño y sus propiedades pueden ser moduladas con pequeñas modificaciones químicas. Algunos de los más utilizados son cumarinas, dansilo (Ds), 7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-ilo (NBD), fluoresceína, rodaminas y boro-dipirrometanos (BODIPYs) (Figura 3A). Por otro lado, debido a la especificidad y fortaleza de la unión biotina-estreptavidina ($K_a = 2.5 \cdot 10^{13} \text{ M}^{-1}$),⁵⁰ la subunidad de biotina es especialmente interesante como marcador. Además, confiere a la sonda un alto grado de versatilidad puesto que existen una gran variedad de conjugados fluorescentes de estreptavidina que permiten detectar el marcaje

a diversas longitudes de onda, así como derivados de estreptavidina unidos a un soporte sólido, que permite la captura de las proteínas que interaccionan con la sonda (Figura 3B).

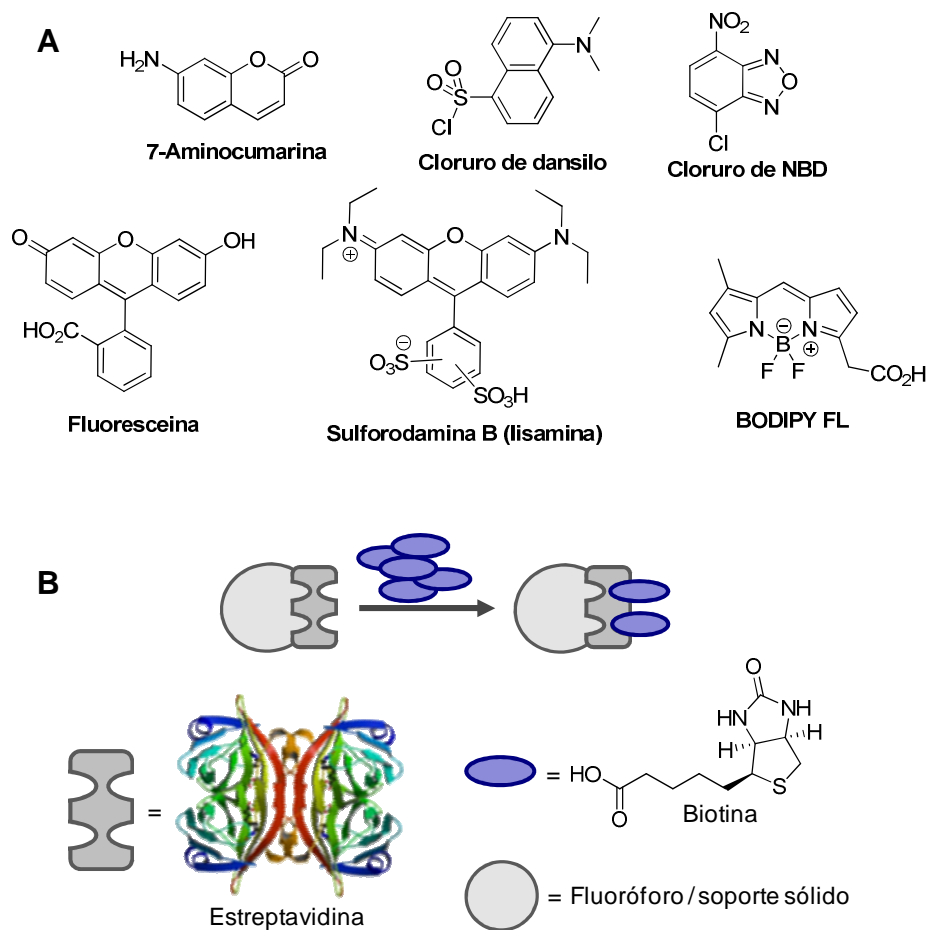


Figura 3. (A) Fluoróforos más comunes empleados en experimentos de imagen en sistemas biológicos. (B) Esquema de la unión biotina-estreptavidina.

En el caso de las enzimas en las que el sustrato no se une de forma covalente a un residuo del centro activo, como es el caso de las metaloproteasas, el desarrollo de ABPs implica un grado extra de complejidad. En estos casos, las sondas incorporan un grupo de fotoentrecruzamiento en su estructura de forma que al irradiar a la longitud de onda adecuada, se genera un enlace covalente entre la sonda y los residuos de la enzima que están próximos en el espacio. Los grupos fotoentrecruzables más comúnmente empleados son arilazidas, diazirinas y diarilcetonas.⁵¹

Hasta el momento, se han utilizado sondas de actividad con un fluoróforo para seguir procesos de apoptosis mediante experimentos de imagen *in vivo*,⁵² así como en la

identificación de actividades enzimáticas elevadas en tumores⁵³ y obesidad.⁵⁴ Además, con las ABPs se pueden obtener perfiles de interacción de una molécula en proteomas complejos lo que ha permitido estudiar las dianas asociadas a diversas enfermedades bacterianas como la malaria⁵⁵ y las enzimas relacionadas con la resistencia a antibióticos.⁵⁶ Por otra parte, esta metodología ha hecho posible la identificación de nuevos inhibidores enzimáticos de hidrolasas dependientes de serina mediante técnicas de cribado.⁵⁷ Hasta la fecha, el gran potencial de las ABPs se ha limitado básicamente al estudio de las enzimas, y se han desarrollado sondas de actividad para una gran variedad de familias enzimáticas, como las hidrolasas y las proteasas dependientes de serina,^{58,59} las proteasas dependientes de cisteína⁶⁰ o las metaloproteasas.⁶¹ Sin embargo, son escasos los trabajos llevados a cabo con el fin de desarrollar sondas dirigidas al estudio de proteínas carentes de actividad enzimática. Así los laboratorios Licht han descrito una ABP dirigida a un canal iónico, el receptor de acetilcolina,⁶² y los ejemplos de sondas dirigidas al estudio de los GPCRs son muy limitados a pesar de su importancia como dianas terapéuticas.⁶³

Dentro de la gran familia de GPCRs hemos seleccionado el receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} por el interés que presenta desde el punto de vista terapéutico, en patologías como ansiedad, depresión, Parkinson, isquemia cerebral y dolor,⁶⁴ así como por la experiencia previa del grupo de investigación.⁶⁵⁻⁷⁴ Esto hace del receptor 5-HT_{1A} el candidato ideal para sentar las bases como prueba de concepto de una nueva metodología basada en el desarrollo de sondas moleculares para GPCRs.

Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo es el desarrollo de sondas dirigidas al receptor de serotonina 5-HT_{1A}, que permitan:

- 1) Su visualización en sistemas nativos, lo que podría aportar una información valiosa acerca de la localización, internalización y densidad del receptor, así como las diferencias de expresión entre estados fisiológicos y patológicos.
- 2) El estudio de la oligomerización en sistemas nativos para comprender el papel que juega en la regulación de este receptor.
- 3) Su aplicación a experimentos de proteómica para realizar el perfil de selectividad de un ligando e identificar el panel de *off-targets* de manera eficaz, lo que puede contribuir a determinar el mecanismo de acción de dicho ligando, así como identificar nuevas dianas terapéuticas.

La consecución de cada uno de estos tres objetivos concretos implica el diseño de las sondas, su síntesis y la evaluación de sus propiedades para su aplicación en sistemas biológicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. Sondas para la visualización del receptor 5-HT_{1A}

2.1.1. Diseño

Dentro de las sondas moleculares dirigidas al estudio del receptor 5-HT_{1A}, nos planteamos en primer lugar el diseño de aquellas que permitan la visualización de los receptores en sistemas biológicos de complejidad creciente. La diferencia entre las ABPs (véase Figura 2) y una sonda para GPCRs (Figura 4) es que en lugar de un grupo reactivo la segunda debe tener un grupo de unión, derivado de un ligando de gran afinidad por el receptor objeto de estudio.

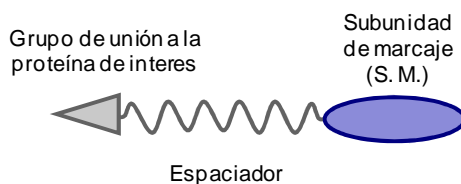
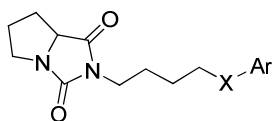


Figura 4. Esquema de una sonda para la visualización de GPCRs.

Teniendo en cuenta la estructura general de una sonda para GPCRs, el primer paso en el diseño de sondas para el receptor 5-HT_{1A} consiste en la selección del grupo de unión. Dentro de la amplia librería de ligandos 5-HT_{1A} disponibles en el grupo de investigación,⁶⁵⁻⁷⁴ se han seleccionado los compuestos **1-4** como grupos de unión, considerando la elevada afinidad de los derivados de arilpiperazina **1** y **2**, así como la selectividad frente al resto de receptores de serotonina que presentan los ligandos **3** y **4** (Tabla 1).^{65-67,74} Estos esqueletos constituyen el punto de partida para el diseño de sondas moleculares dirigidas al receptor 5-HT_{1A}.

Tabla 1. Perfil de afinidad de los ligandos **1-4** seleccionados como grupos de unión para el diseño de sondas moleculares dirigidas al receptor 5-HT_{1A}.

Comp.	X	Ar	$K_i \pm E. E.^a$ (nM)				
			5-HT _{1A}	5-HT _{2A}	5-HT _{5A}	5-HT ₆	5-HT ₇
1			2.4 ± 0.1	30 ± 13	>1000	>1000	8 ± 1
2			5.5 ± 0.7	>1000	>1000	>1000	28 ± 7
3	-NH-CH ₂ -CH ₂ -		28 ± 3	>1000	>1000	>1000	>1000
4	-NH-CH ₂ -CH ₂ -O-		25.4 ± 0.8	>1000	>1000	>1000	>1000

^a Los valores obtenidos corresponden a la media y el error estándar (E. E.) de dos a cuatro experimentos individuales realizados por triplicado.

En estos ligandos, la incorporación de la subunidad de marcaje adecuada se diseñó bien mimetizando la subunidad aromática o bien teniendo en cuenta los estudios de relación estructura-actividad previos llevados a cabo en el grupo de investigación con este tipo de ligandos, los cuales indican que se pueden introducir sustituyentes voluminosos en el carbono cabeza de puente de la hidantoína sin que se vea muy afectada su afinidad por el receptor 5-HT_{1A}.⁶⁸ Puesto que la primera aplicación va a ser la visualización de los receptores en sistemas celulares, como subunidades de marcaje se escogieron los fluoróforos dansilo y análogos, NBD y sulforodamina B (lisamina); un fragmento de biotina, ya que ésta es reconocida específicamente por una gran variedad de derivados fluorescentes comerciales de estreptavidina; o un alquino terminal que nos permitirá incorporar las subunidades de marcaje mencionadas mediante la reacción de cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen después de la unión del ligando al receptor, en el caso de que las sondas fluorescentes o biotiniladas pierdan la afinidad por el receptor 5-HT_{1A}. De esta manera, se han diseñado los compuestos marcados **5-22** en los que se ha explorado la viabilidad de introducir la subunidad de marcaje en los dos posibles puntos de funcionalización comentados para los ligandos **1-4**: a) la subunidad aromática o b) el carbono cabeza de puente de la biciclohidantoína (Figura 5). En este último caso se ha utilizado una cadena metilénica de 4 ó 7 unidades como espaciador, con el fin de evitar que la subunidad de marcaje interfiera en la afinidad de los nuevos compuestos marcados por el receptor.

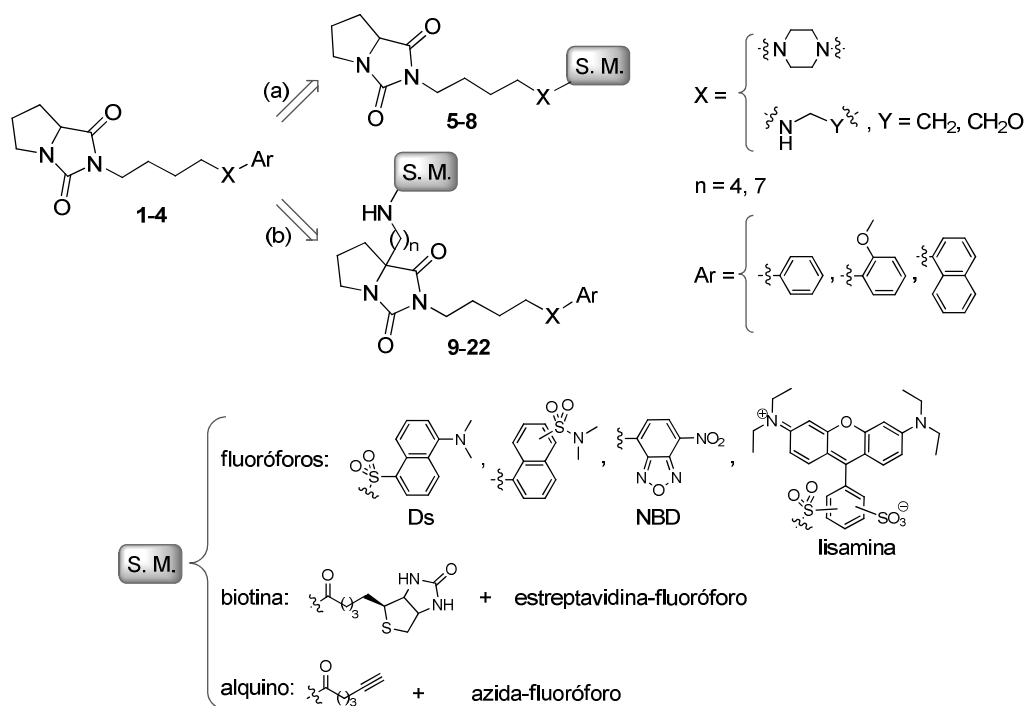
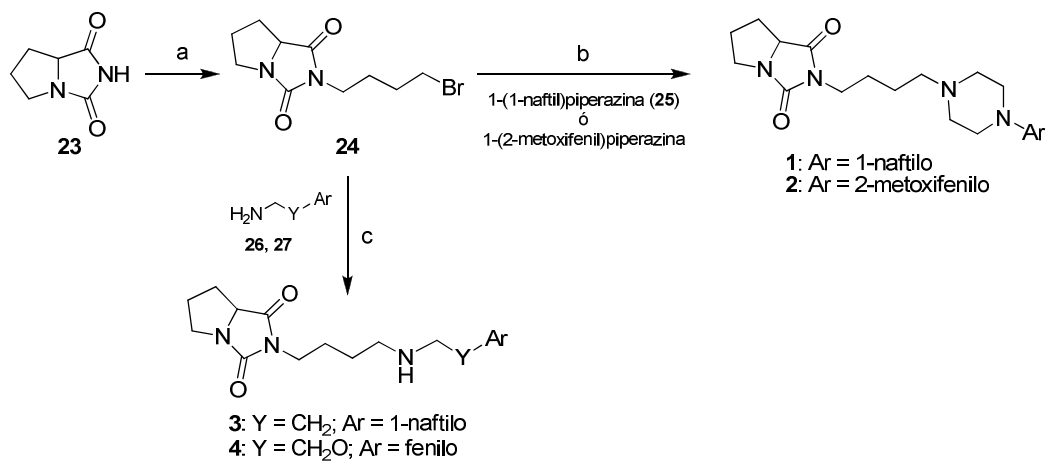


Figura 5. Diseño de sondas para la visualización celular del receptor 5-HT_{1A}.

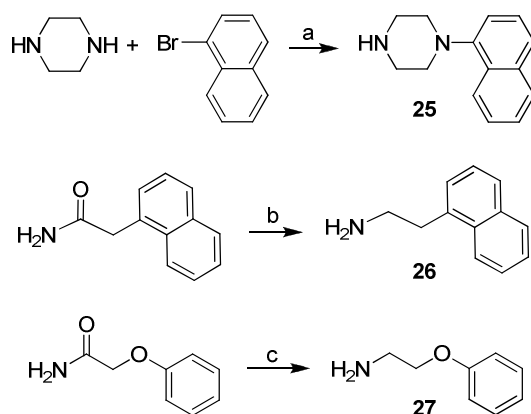
2.1.2. Síntesis

La síntesis de los ligandos no marcados **1-4**^{65-67,74} se llevó a cabo a partir de la hidantoína **23**,⁷⁵ por tratamiento con 1,4-dibromobutano en presencia de hidruro sódico y posterior reacción de sustitución nucleófila del derivado halogenado **24**⁷⁴ con la amina correspondiente (Esquema 1).



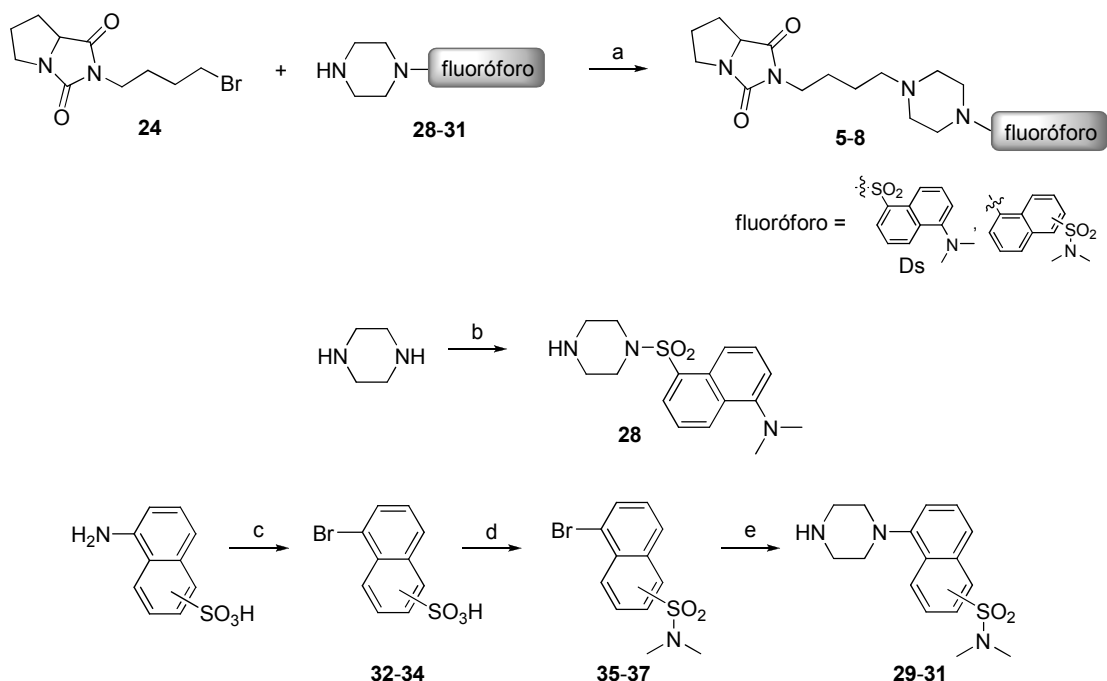
Esquema 1. Reactivos: a) NaH, 1,4-dibromobutano, DMF, 110 °C, 79%; b) Et₃N, CH₃CN, Δ, 95-98%; c) CH₃CN, Δ, 54-57%.

1-(1-Naftil)piperazina (**25**) se sintetizó siguiendo el método descrito previamente en nuestro grupo de trabajo, basado en la reacción de aminación de Buchwald-Hartwig de haluros de arilo catalizada por especies de paladio (0) estabilizadas con fosfinas como ligandos coordinantes.⁶⁷ Así, el acoplamiento de piperazina y 1-bromonaftaleno se ha llevado a cabo empleando (\pm)-2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo (BINAP) como fosfina y *tert*-butóxido sódico como base (Esquema 2). Las aminas **26**⁶⁶ y **27**⁶⁵ se obtuvieron por reducción de las amidas correspondientes con diborano en THF o con el complejo borano-sulfuro de dimetilo en THF y diglime.



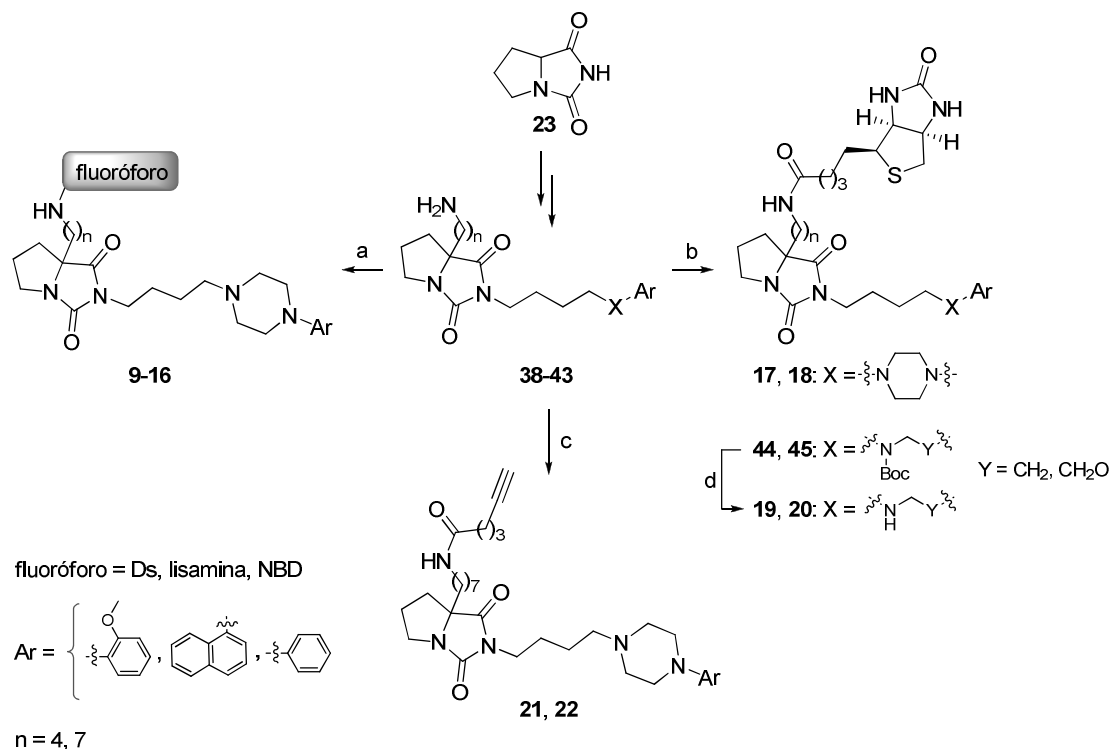
Esquema 2. Reactivos: a) Pd(AcO)₂, BINAP, NaO^tBu, tolueno, Δ , 78%; b) (BH₃)₂, THF, 0 °C, 62%; c) (CH₃)₂S-BH₃ (2 M en THF), diglime, Δ , 88%.

En la primera serie de compuestos marcados **5-8**, se ha considerado el dansilo como fluoróforo ya que su esqueleto de naftaleno podría mimetizar la subunidad aromática del ligando no marcado derivado de naftilpiperazina **1**. Además, se han explorado otros derivados de naftaleno fluorescentes en los que se ha modificado la posición del grupo dimetilaminosulfonilo (Esquema 3). La síntesis de los compuestos **5-8** se ha llevado a cabo por sustitución nucleófila del derivado halogenado **24** con la arilpiperazina correspondiente **28-31**, empleando trietilamina como base. La arilpiperazina **28** se sintetizó por tratamiento de piperazina con cloruro de dansilo, siguiendo el procedimiento previamente descrito en la bibliografía;⁷⁶ mientras que las arilpiperazinas **29-31** se han preparado según la ruta sintética que se detalla en el Esquema 3. Así, la reacción de diazotación de los ácidos aminonaftalenosulfónicos comerciales correspondientes, seguido del tratamiento con bromuro de cobre y ácido bromhídrico dio lugar a los ácidos bromonaftalenosulfónicos **32-34**, que se transformaron en las dimetilsulfonamidas **35-37**, cuyo acoplamiento con piperazina proporcionó las naftilpiperazinas de interés **29-31**.



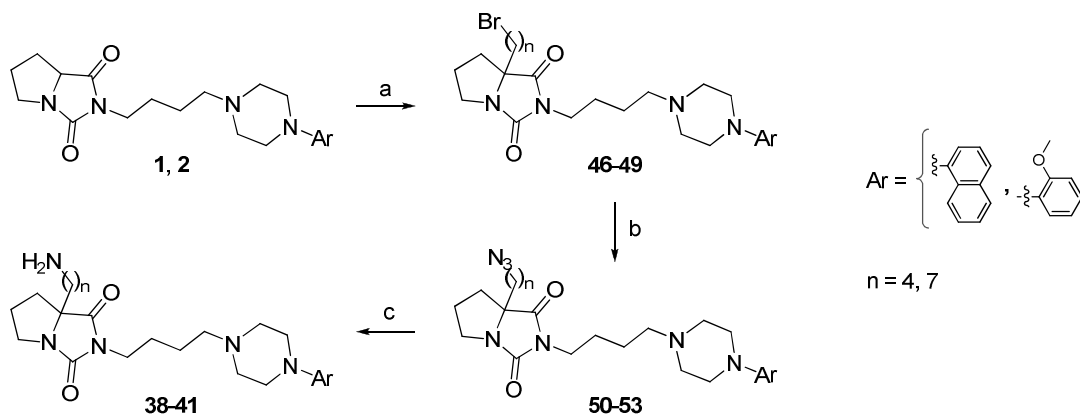
Esquema 3. Reactivos: a) Et_3N , CH_3CN , 60 °C, 53-99%; b) Ds-Cl, CH_2Cl_2 , t.a., 93%; c) i. NaNO_2 , NaOH, HBr (33% en ácido acético), -5 °C; ii. urea, CuBr, HBr (33% en ácido acético), 80 °C, 54-58%; d) i. SOCl_2 , DMF, 85 °C; ii. $(\text{CH}_3)_2\text{NH}$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{THF}$, 0 °C a t.a. 53-61%; e) piperazina, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, BINAP, NaO^tBu , tolueno, 75 °C, 43-77%.

Por otra parte, los compuestos finales **9-22**, en los que la subunidad de marcaje se ha incorporado en la biciclohidantoína, se han preparado mediante la alquilación del carbono cabeza de puente del biciclo con una cadena metilénica funcionalizada con un grupo amino terminal, seguido de la incorporación de la subunidad de marcaje (Esquema 4). Así por reacción de condensación de las aminas intermedias **38-43** con el cloruro del fluoróforo correspondiente (Ds, lisamina, o NBD)(**9-16**), biotina (**17-20**) o ácido 5-hexinoico (**21, 22**), se obtuvieron los compuestos marcados **9-22**. En el caso de los derivados biotinilados **19** y **20** fue necesario realizar la desprotección del grupo *tert*-butoxicarbonilo (Boc) de los intermedios protegidos **44** y **45** en medio ácido.



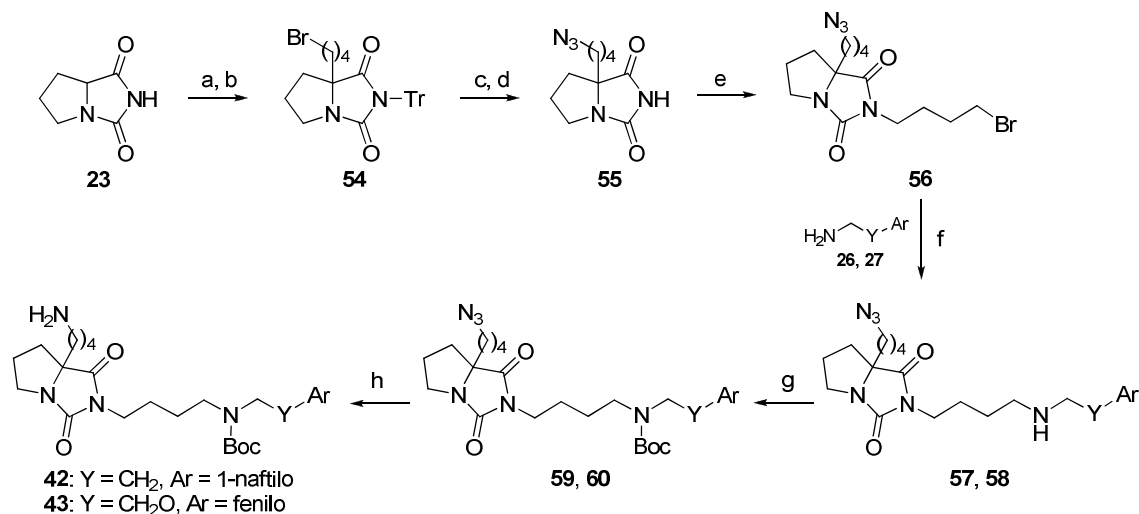
Esquema 4. Reactivos: a) fluoróforo-Cl, Et₃N, CH₂Cl₂ ó THF, t.a., 25-82%; b) biotina, DCC ó EDC, HOBT, DMAP, DMF, CH₂Cl₂, t.a., 50-70%; c) ácido 5-hexinoico, DCC, DMAP, CH₂Cl₂, t.a., 46-60%; d) TFA, CH₂Cl₂, t.a., 78-87%.

La síntesis de las aminas intermedias **38-41** se llevó a cabo a partir de los compuestos **1** y **2** siguiendo la secuencia de reacciones representada en el Esquema 5. La alquilación del carbono cabeza de puente de la biciclohidantoína con 1,4-dibromobutano ó 1,7-dibromoheptano, en presencia de diisopropilamido de litio (LDA), permitió obtener los bromoderivados **46-49**, cuyo tratamiento con azida sódica, seguido de la reducción de las alquilazidas obtenidas **50-53** con trifenilfosfina proporcionó las aminas deseadas **38-41**.



Esquema 5. Reactivos: a) i. LDA, THF, 0 °C; ii. 1,4-dibromobutano ó 1,7-dibromoheptano, THF, t.a., 74-89%; b) NaN_3 , DMF, H_2O , 50 °C, 87-92%; c) PPh_3 , THF, H_2O , t.a., 84-92%.

Las aminas intermedias **42** y **43** se sintetizaron siguiendo la secuencia de reacciones recogida en el Esquema 6. La C-alkilación con 1,4-dibromobutano de la biciclohidantoína **23** convenientemente protegida con el grupo tritilo (Tr), seguido de la sustitución nucleófila del derivado halogenado **54** con azida sódica, desprotección y posterior N-alkilación de **55** con 1,4-dibromobutano en presencia de hidruro sódico dio lugar al derivado halogenado **56**. A continuación, la sustitución nucleófila de **56** con las aminas **26** y **27** en exceso permitió obtener las aminas secundarias **57** y **58**, cuya protección con cloruro de Boc y posterior reducción de las azidas **59** y **60** con trietilfosfina dio lugar a las aminas deseadas **42** y **43**.



Esquema 6. Reactivos: a) NaH, Tr-Cl, DMF, 60 °C, 96%; b) i. LDA, THF, 0 °C, ii. 1,4-dibromobutano, t.a., 81%; c) NaN_3 , DMF, H_2O , M.W., 130 °C, 93%; d) TFA, CH_2Cl_2 , t.a., 92%; e) NaH, 1,4-dibromobutano, DMF, 110 °C, 85%; f) CH_3CN , Δ , 67-83%; g) Boc_2O , K_2CO_3 , THF, H_2O , t.a., 74-85%; h) PPh_3 , THF, H_2O , t.a., 56-66%.

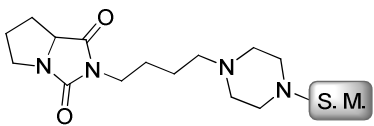
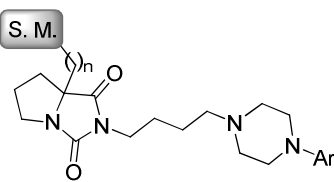
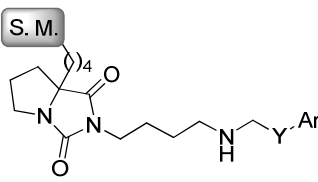









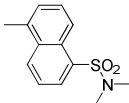

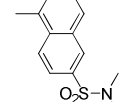

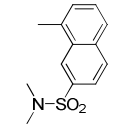







2.1.3. Afinidad por el receptor 5-HT_{1A}

La determinación de la afinidad de los compuestos sintetizados se realizó mediante experimentos de desplazamiento de radioligando *in vitro* empleando la línea celular HEK-293-EBNA transfectada con el receptor humano 5-HT_{1A} y el ligando tritiado [³H]-OH-DPAT. Los ensayos de inhibición competitiva consistieron en incubar el homogeneizado de membrana con el radioligando y el compuesto objeto de estudio, con el fin de medir la capacidad de éste para desplazar al primero en su unión al receptor. La incubación se finalizó por filtración y la radioactividad unida a las membranas se cuantificó mediante espectrometría de centelleo.

En los casos en los que el porcentaje de desplazamiento del radioligando es mayor del 50% a una concentración de 1 μ M, se ha obtenido la curva completa dosis-respuesta a seis concentraciones diferentes del compuesto correspondiente, a partir de la cual se ha determinado el valor de la concentración a la que el compuesto es capaz de desplazar un 50% al radioligando, denominada concentración inhibitoria 50 (CI₅₀). La constante de afinidad K_i se ha calculado a partir del valor de CI₅₀ utilizando la ecuación de Cheng y Prusoff⁷⁷ [$K_i = CI_{50}/(1 + L/K_D)$] donde L es la concentración de radioligando y K_D su constante de disociación. Los valores obtenidos corresponden a la media y error estándar de dos a cuatro experimentos individuales realizados por triplicado.

En la Tabla 2 se recogen los datos de afinidad por el receptor 5-HT_{1A} de los nuevos compuestos marcados derivados de los ligandos **1-4**. Como se puede observar en la tabla, los compuestos en los que el fluoróforo trata de mimetizar la subunidad aromática (**5-8**) resultaron prácticamente inactivos, a excepción del compuesto **8**, en el que la presencia del grupo dimetilaminosulfonilo en posición 7 del anillo de naftaleno es favorable para la afinidad por el receptor 5-HT_{1A} ($K_i = 2.4$ nM). Por el contrario, todos los compuestos en los que el marcaje se introduce en la biciclohidantoína (**9-22**) mantienen la afinidad por el receptor 5-HT_{1A} en el intervalo nanomolar ($K_i = 2.0-95$ nM), confirmándose la hipótesis inicial de que pueden incorporarse subunidades de marcaje en el carbono cabeza de puente de la biciclohidantoína sin que disminuya drásticamente la afinidad. No obstante, en el caso de los compuestos **19** y **20** ($K_i = 68$ y 95 nM, respectivamente) se produce una mayor pérdida de afinidad con respecto a los ligandos sin marcar **3** y **4** ($K_i = 28$ y 25.4 nM, respectivamente). Con respecto a la subunidad de marcaje, los compuestos con lisamina presentan, en general, una afinidad menor que los compuestos con otras subunidades de marcaje de menor tamaño como el dansilo [e.g. K_i (**9**) = 2.0 nM vs K_i (**13**) = 10 nM; K_i (**10**) = 5 nM vs K_i (**14**) = 20 nM]. Por otro lado, la longitud del espaciador entre el ligando y la subunidad de marcaje no parece ejercer una gran influencia en la afinidad 5-HT_{1A} de los nuevos ligandos marcados [e.g. K_i (**11**) = 11 nM vs K_i (**12**) = 15 nM]. Finalmente, de las dos subunidades aromáticas seleccionadas (2-metoxifenilo y 1-naftilo), el anillo de naftaleno es el más favorable para la afinidad [e.g. K_i (**9**) = 2.0 nM vs K_i (**11**) = 11 nM], al igual que ocurre en los ligandos sin marcar **1** y **2**.

Tabla 2. Afinidades de los nuevos compuestos marcados **5-22** por el receptor 5-HT_{1A}.

 <p>5-8</p>					 <p>9-18, 21, 22</p>					 <p>19, 20</p>				
Comp.	S. M.	n / Y	Ar	$K_i \pm E. E.^a$ (nM)	Comp.	S. M.	n / Y	Ar	$K_i \pm E. E.^a$ (nM)					
1				2.4 ± 0.5	12	Ds	7		15 ± 3					
2				12 ± 3	13	lisamina	4		10 ± 2					
3				28 ± 3	14	lisamina	7		20 ± 1					
4				25.4 ± 0.8	15	NBD	4		6 ± 1					
5	Ds	-	-	>1000	16	NBD	7		10.8 ± 0.2					
6		-	-	350 ± 20	17	biotina	4		4.7 ± 0.3					
7		-	-	98 ± 11	18	biotina	7		11 ± 1					
8		-	-	2.4 ± 0.1	19	biotina	CH ₂		68 ± 7					
9	Ds	4		2.0 ± 0.6	20	biotina	CH ₂ O		95 ± 13					
10	Ds	7		5 ± 3	21	alquino	7		5.5 ± 0.3					
11	Ds	4		11 ± 3	22	alquino	7		15 ± 5					

^a Los valores obtenidos corresponden a la media y el error estándar (E. E.) de dos a cuatro experimentos individuales realizados por triplicado.

2.1.4. Propiedades fluorescentes

Las propiedades fluorescentes de los compuestos **6-16** se determinaron a la concentración de 10 μM en el tampón de incubación del ensayo de afinidad (Tris·HCl 50 mM, MgSO_4 0.5 mM, pH = 7.4 a 25 °C). La longitud de onda de excitación (λ_{ex}) se seleccionó a partir del espectro de absorción ultravioleta-visible registrado previamente. En la Tabla 3 se recogen los datos de fluorescencia expresados como longitud de onda máxima de emisión (λ_{em}) e intensidad de emisión (I_{em}) en unidades arbitrarias (u.a.), obtenidas a la λ_{ex} con rendijas de emisión de 2.5 y/ó 5 nm. El análisis de las propiedades fluorescentes indica que los ligandos marcados con Ds (**9-12**) o con otros derivados de dimetilaminosulfonilnaftaleno (**6-8**) son los que necesitan longitudes de onda de excitación más bajas y presentan mayores desplazamientos de Stokes (λ_{ex} = 320-350 nm y λ_{em} = 465-526 nm) que los derivados de lisamina (**13** y **14**) (λ_{ex} = 560 nm y λ_{em} = 584, 587 nm) o NBD (**15** y **16**) (λ_{ex} = 478 nm y λ_{em} = 528 nm). Además, los derivados de Ds son los que muestran las I_{em} más elevadas, alcanzándose incluso el nivel de saturación para la rendija de emisión de 2.5 nm en el caso de los compuestos **9** y **10**, mientras que los derivados de lisamina **14** y de NBD **15** y **16** no son fluorescentes en las mismas condiciones y la fluorescencia del ligando con lisamina **13** es muy débil (I_{em} = 476 u.a. con rendija de emisión de 5 nm). Para los compuestos que presentan las mayores I_{em} (**8-10** y **12**) se determinó el rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_f = 0.10, 0.26, 0.24 y 0.18, respectivamente), observándose que los compuestos **9** y **10** presentan los valores más elevados.

Tabla 3. Propiedades fluorescentes de las sondas **6-16**.

Comp.	Fluorescencia (10 μM)			Comp.	Fluorescencia (10 μM)		
	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	I_{em} (u.a.) (rendija emisión)		λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	I_{em} (u.a.) (rendija emisión)
6	350	509	930 (5)	12	340	480	665 (2.5) >1000 (5)
7	350	465	800 (5)	13	560	587	476 (5)
8	350	470	>1000 (5)	14	560	584	68 (5)
9	320	484	>1000 (2.5)	15	478	528	35 (5)
10	320	480	>1000 (2.5)	16	478	528	0 (5)
11	328	526	218 (5)				

En resumen, los compuestos marcados con mayor afinidad y buenas propiedades fluorescentes son los derivados de naftilpiperazina **9** y **10** (Tablas 2 y 3). Asimismo, destacan los derivados biotinilados **17** y **18** y el ligando marcado con un alquino terminal **21** ya que presentan elevada afinidad 5-HT_{1A}. Todos ellos podrían ser buenos candidatos para ser empleados como sondas para la visualización celular del receptor 5-HT_{1A}.

2.1.5. Visualización

- **Visualización del receptor 5-HT_{1A} en células transfectadas**

Hemos seleccionado la sonda **9** para llevar a cabo la visualización del receptor 5-HT_{1A} en células transfectadas por su elevada afinidad ($K_i = 2.0$ nM, Tabla 2) y buenas propiedades fluorescentes ($I_{em} > 1000$ u.a., $\Phi_f = 0.26$, Tabla 3). Asimismo, la sonda funcionalizada con biotina **17** ($K_i = 4.7$ nM, Tabla 2) también se ha empleado en este experimento para poner a punto la visualización del receptor con el conjugado de estreptavidina.

En ambos casos, se han incubado células CHO transfectadas de forma estable con el receptor humano 5-HT_{1A} en presencia de la sonda correspondiente. Tras eliminar el exceso de sonda mediante sucesivos lavados, y en el caso del derivado de biotina **17** añadir después estreptavidina conjugada con el fluoróforo Alexa Fluor 488, las células se han visualizado con un microscopio de fluorescencia (Figura 6). Las imágenes muestran que las sondas **9** (Figura 6A) y **17** (Figura 6D) permiten la visualización directa del receptor 5-HT_{1A}.⁷⁸ Para evaluar la especificidad del marcaje, se han realizado experimentos en paralelo en los que las sondas **9** ó **17** se han desplazado utilizando un exceso de ligando no fluorescente **1**, observándose que la fluorescencia disminuye en ambos casos (Figuras 6B y 6E), y es comparable a la autofluorescencia de las células (Figuras 6C y 6F).

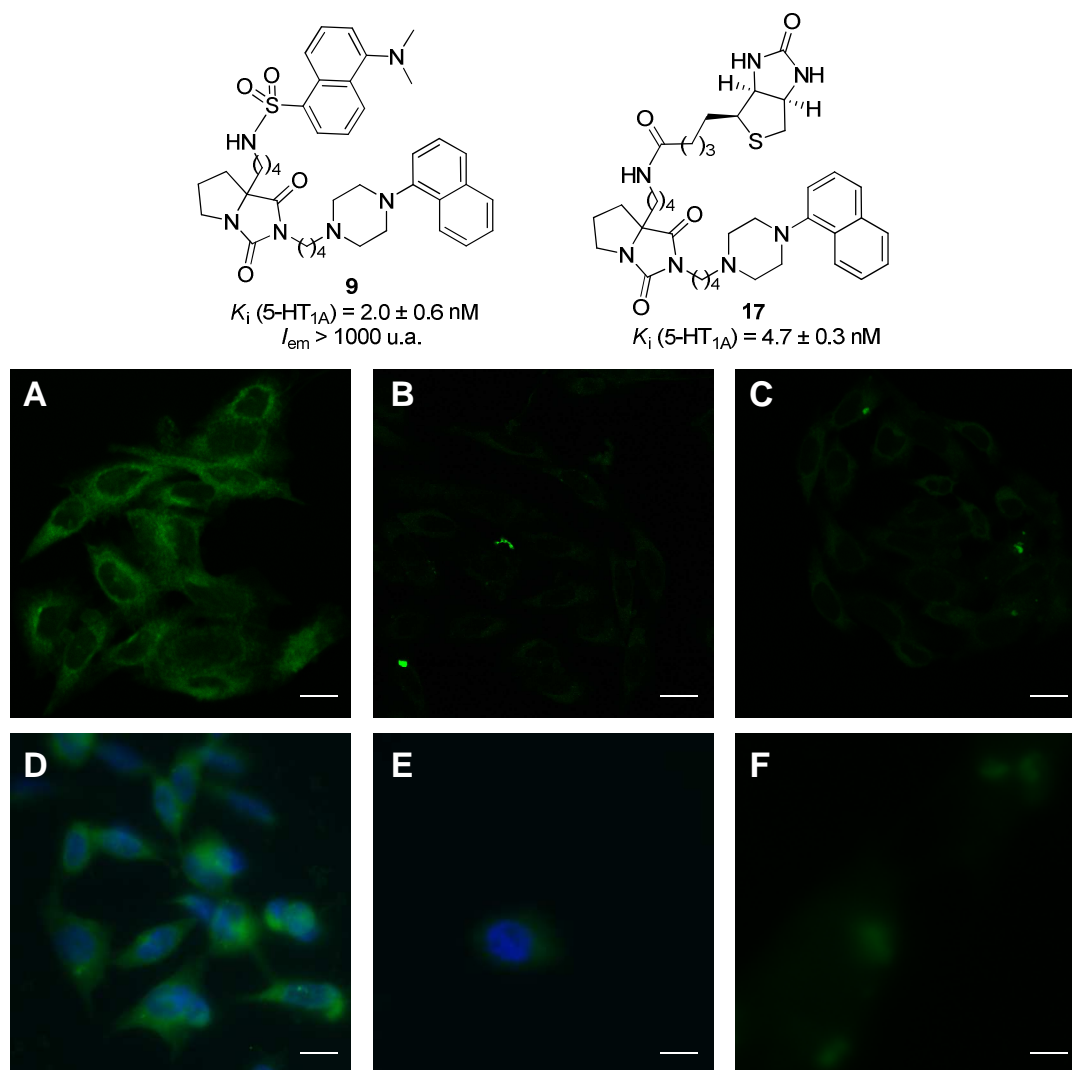


Figura 6. Visualización del receptor 5-HT_{1A} en células CHO transfectadas. (A) Las células se incubaron en presencia de la sonda **9** (250 nM) ó (D) **17** (500 nM), seguido del tratamiento con el conjugado de estreptavidina Alexa Flúor 488. (B) y (E) Unión inespecífica tras el desplazamiento de la sonda con exceso del ligando no fluorescente **1** (50 μM). (C) y (F) Autofluorescencia de las células en ausencia de sonda. Escala: 20 μm.

• Visualización del receptor 5-HT_{1A} en sistemas nativos

Una vez comprobada la validez de las sondas marcadas con dansilo o biotina para la visualización del receptor 5-HT_{1A} en células transfectadas, nos planteamos extender este marcaje a sistemas nativos. Para llevar a cabo la visualización del receptor en estos sistemas, es importante que las sondas tengan un buen perfil de selectividad, además de afinidad por el receptor 5-HT_{1A}, ya que el sistema biológico tiene una complejidad mayor. Por tanto, se determinó el perfil de selectividad frente a otros tipos de receptores de serotonina (5-HT_{2A},

5-HT_{5A}, 5-HT₆ y 5-HT₇) para una selección de sondas con elevada afinidad 5-HT_{1A} y/o buenas propiedades fluorescentes. Los resultados obtenidos (Tabla 4) indican que, en general, las sondas sintetizadas mantienen el perfil de selectividad de su precursor no marcado. Así, los compuestos **9**, **17** y **19** son selectivos frente a los receptores 5-HT_{5A} y 5-HT₆, aunque presentan afinidad en el intervalo nanomolar por los receptores 5-HT_{2A} ($K_i = 17\text{-}55\text{ nM}$) y 5-HT₇ ($3\text{-}12\text{ nM}$), al igual que el ligando **1**. En el caso de los compuestos marcados con biotina **19** y **20** también se observa un perfil análogo al de sus precursores selectivos **3** y **4**, destacando la sonda **19** ya que es selectiva frente al resto de receptores de serotonina ensayados ($K_i > 1000\text{ nM}$, Tabla 4), si bien presenta una afinidad marginal por el receptor 5-HT₇ [K_i (5-HT₇) = 860 nM], 12.6 veces menor que por el receptor 5-HT_{1A}. Por tanto, se ha seleccionado la sonda **19** funcionalizada con biotina para llevar a cabo experimentos de visualización en neuronas, ya que exhibe una buena afinidad por el receptor 5-HT_{1A} ($K_i = 68\text{ nM}$) y una elevada selectividad, ($K_i > 800\text{ nM}$, Tabla 4).

Tabla 4. Perfil de selectividad de los ligandos marcados seleccionados frente a otros receptores de serotonina.

Comp.	S.M.	n / Y	Ar	$K_i \pm E. E.^a$ (nM)				
				5-HT _{1A}	5-HT _{2A}	5-HT _{5A}	5-HT ₆	5-HT ₇
1				2.4 ± 0.5	30 ± 13	>1000	>1000	8 ± 1
9	Ds	4		2.0 ± 0.6	28 ± 1	170 ± 90	336 ± 13	11 ± 1
17	biotina	4		4.7 ± 0.3	55 ± 27	>1000	>1000	3.0 ± 0.8
21	alquino	7		5.5 ± 0.3	17 ± 5	>1000	>1000	12 ± 9
3				28 ± 3	>1000	>1000	>1000	>1000
4				25.4 ± 0.8	>1000	>1000	>1000	>1000
19	biotina	CH ₂		68 ± 7	>1000	>1000	>1000	860 ± 100
20	biotina	CH ₂ O		95 ± 13	>1000	>1000	>1000	94 ± 12

^a Los valores obtenidos corresponden a la media y el error estándar (E. E.) de dos a cuatro experimentos individuales realizados por triplicado.

Como sistema nativo se han elegido neuronas de hipocampo, que se caracterizan por una alta densidad de receptores 5-HT_{1A}.⁷⁹ Así, se han incubado neuronas de hipocampo en presencia de la sonda **19**, el exceso de sonda se ha eliminado mediante sucesivos lavados, y a continuación se ha añadido estreptavidina conjugada con el fluoróforo Alexa Fluor 488. Las células se han visualizado con un microscopio de fluorescencia (Figura 7). Los experimentos de visualización en neuronas de hipocampo de rata con la sonda **19** (Figura 7A) muestran que el marcaje con esta co-localiza con el del anticuerpo H-119 (Santa Cruz), específico del receptor 5-HT_{1A} (Figuras 7B y 7C). Es decir, se ha desarrollado la primera sonda molecular que permite la visualización directa del receptor 5-HT_{1A} en sistemas nativos de forma específica y con niveles de marcaje comparables e incluso superiores a los de un anticuerpo. Este resultado confirma que es posible el empleo de moléculas pequeñas y abre la puerta a su empleo en modelos *in vivo* o en otros sistemas donde los anticuerpos no pueden utilizarse.

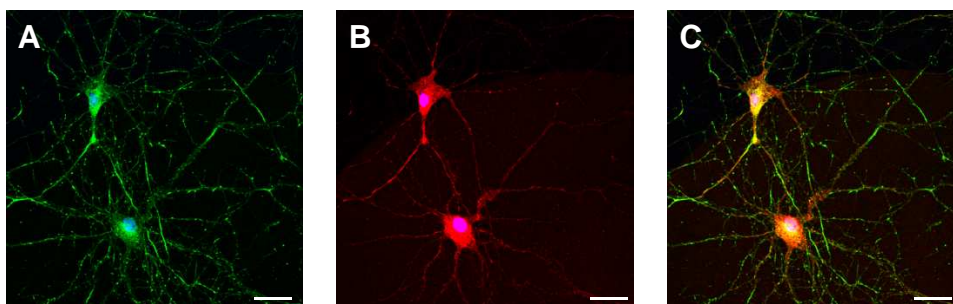
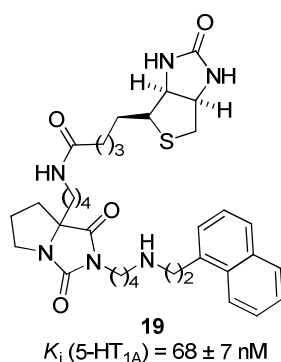


Figura 7. Visualización del receptor 5-HT_{1A} en neuronas de hipocampo de rata. (A) Neuronas incubadas en presencia de la sonda **19** (2.5 μM) (verde). (B) Inmunocytoquímica con el anticuerpo 5-HT_{1A} H-119 (rojo). (C) Co-localización de la sonda **19** (2.5 μM) y el anticuerpo 5-HT_{1A} H-119. Escala: 20 μm.

2.2. Sondas para el estudio del estado de oligomerización del receptor 5-HT_{1A}

La oligomerización de GPCRs, bien para formar homo- o hetero-oligómeros, constituye un área de investigación de gran interés en la actualidad, ya que está implicada en la regulación de este tipo de receptores. Los oligómeros presentan características funcionales diferentes a las de los receptores que los constituyen,²⁵⁻³¹ por lo que resulta de gran interés

poder evaluar la formación de este tipo de asociaciones en sistemas nativos y en último término en experimentos *in vivo*. Las técnicas experimentales que se han aplicado al estudio de la oligomerización de GPCRs han sido hasta el momento la co-inmunoprecipitación⁸⁰ y la transferencia de energía por resonancia (RET).^{81,82} De hecho, el estudio de la oligomerización de GPCRs ha avanzado en paralelo al desarrollo de técnicas de RET, que consisten en la transferencia de energía por resonancia desde un cromóforo en su estado excitado (dador) a una molécula fluorescente (aceptor). Esta transferencia de energía es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia dador-aceptor, es decir, para que exista transferencia esta distancia no debe ser mayor de 10 nm. Teniendo en cuenta que el diámetro de un receptor de 7-TM es de aproximadamente 5 nm, si observamos RET significa que al menos dos GPCRs están interactuando entre sí.⁸²

Cuando tanto el dador como el aceptador son fluorescentes, la técnica se denomina FRET (*fluorescence resonance energy transfer*, Figura 8). Existen diversos ejemplos en la bibliografía del empleo de la técnica FRET para demostrar homo- o hetero-dimerización de GPCRs utilizando las proteínas autofluorescentes amarilla (*yellow fluorescent protein*, YFP) y azul (*cyan fluorescent protein*, CFP, Figura 8A).⁸³⁻⁸⁵ Sin embargo, una de las limitaciones del uso de proteínas autofluorescentes es el alto nivel de perturbación que producen en el sistema biológico. Este inconveniente se podría solucionar con el empleo de sondas moleculares, ya que se podrían utilizar ligandos del receptor de interés marcados con dos fluoróforos entre los que pueda existir FRET para estudiar la dimerización de dicho receptor en la membrana plasmática (Figura 8B). De hecho, mediante esta aproximación se ha demostrado recientemente la oligomerización del receptor de oxitocina en tejido de glándula mamaria.⁸⁶

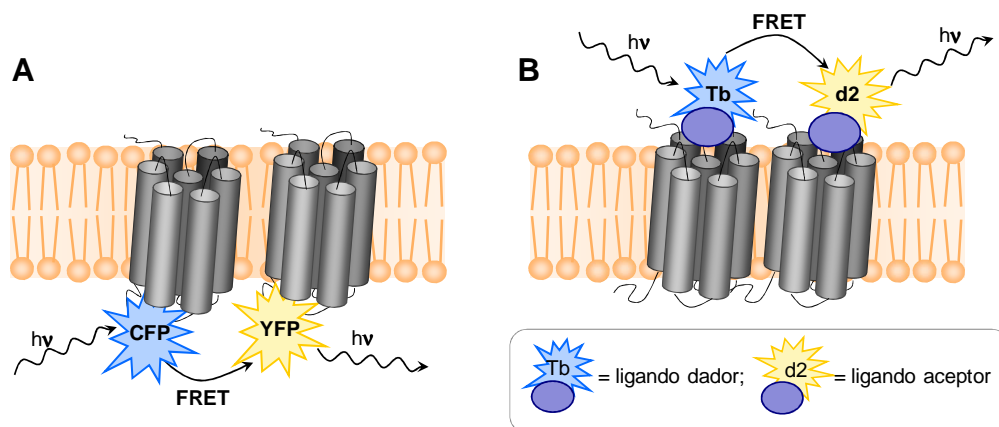


Figura 8. Representación esquemática de la aplicación de la técnica FRET para el estudio de la oligomerización de GPCRs. (A) FRET entre GPCRs modificados con proteínas autofluorescentes. (B) FRET mediado por sondas moleculares.

A pesar de que existen estudios de oligomerización de los receptores 5-HT_{1A} mediante co-inmunoprecipitación⁸⁷ o a través de experimentos de FRET en células que expresan el receptor unido a las proteínas YFP y CFP,⁸³⁻⁸⁵ aún no se han llevado a cabo experimentos que demuestren la oligomerización de este receptor en sistemas nativos.

2.2.1. Diseño

En este contexto, nos hemos propuesto el desarrollo de sondas moleculares que puedan ser utilizadas para estudiar la oligomerización del receptor 5-HT_{1A} en sistemas nativos empleando sondas fluorescentes, donde tanto el dador como el aceptor son moléculas fluorescentes. Para poder llevar a cabo este experimento es imprescindible que las sondas fluorescentes marcadas con el dador y el aceptor presenten una elevada afinidad por el receptor objeto de estudio ($K_i \leq 20$ nM). Además, debido a la autofluorescencia del medio biológico, si queremos tener una relación señal-ruido aceptable, no podemos emplear los fluoróforos tradicionales; en su lugar hay que utilizar fluoróforos compatibles con TR-FRET (*time-resolved* FRET). Estos son fluoróforos derivados de lantánidos que presentan tiempos de emisión más largos que los fluoróforos tradicionales minimizándose el ruido de fondo asociado a FRET, lo que permite medir la fluorescencia del fluoróforo aceptor después de que haya ocurrido la fluorescencia del entorno.⁸⁸

Como grupo de unión hemos seleccionado el ligando **1** ($K_i = 2.4$ nM), basándonos en los datos de afinidad obtenidos con las sondas fluorescentes encaminadas a llevar a cabo estudios de visualización. La subunidad de marcaje fluorescente se va a incorporar en el carbono cabeza de puente de la biciclohidantoína, animados por el hecho de que todas las sondas sintetizadas hasta el momento derivadas de este ligando presentan afinidad por el receptor 5-HT_{1A} en el rango nanomolar ($K_i \leq 20$ nM, Tabla 2). Los fluoróforos seleccionados como dador y aceptor son Lumi4-Tb y d2 derivados de los lantánidos terbio y europio, respectivamente, desarrollados por la compañía Cisbio para llevar a cabo experimentos similares con otros receptores.⁸⁶

2.2.2. Síntesis y afinidad por el receptor 5-HT_{1A}

La síntesis de los nuevos compuestos marcados **UCM-Tb** y **UCM-d2** se ha llevado a cabo a partir de la amina intermedia **38** como se indica en la Figura 9. Tanto el marcaje como la evaluación de la afinidad 5-HT_{1A} de los nuevos ligandos marcados se han realizado en colaboración con Cisbio. Desafortunadamente, la constante de afinidad de los nuevos ligandos fluorescentes, determinada mediante técnicas de fluorescencia, resultó ser mayor de 300 nM para los dos compuestos marcados, por lo que no se han podido llevar a cabo los estudios de la oligomerización del receptor 5-HT_{1A} en sistemas nativos mediante experimentos de FRET.

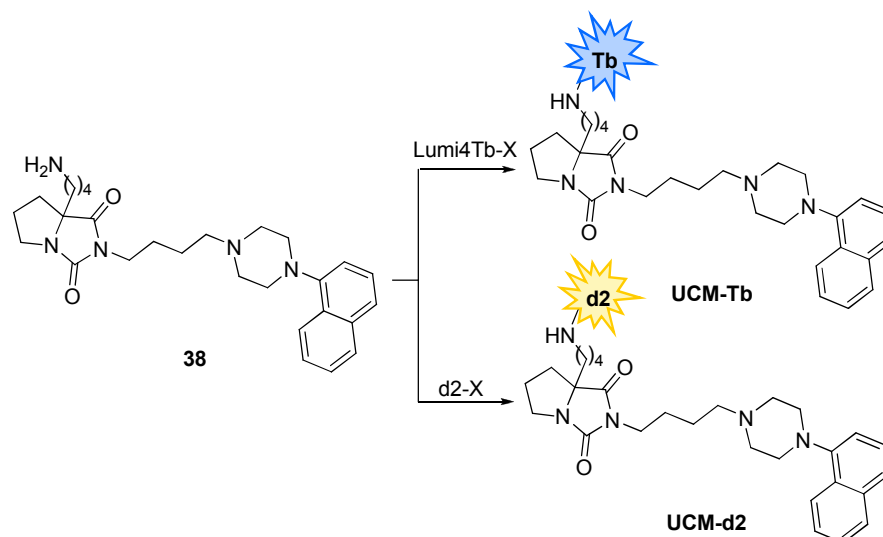


Figura 9. Representación esquemática del marcaje llevado a cabo por la empresa Cisbio para la obtención de los nuevos compuestos **UCM-Tb** y **UCM-d2**.

2.3. Sondas para la identificación de *off-targets* de ligandos del receptor 5-HT_{1A}

Como ya se ha comentado, la implementación de un método experimental que nos permita obtener de forma eficaz el panel completo de proteínas con las que interaccionan los ligandos de GPCRs es una necesidad actual en el desarrollo de fármacos, ya que conocer los *off-targets* de un ligando puede explicar sus aplicaciones terapéuticas, efectos secundarios y contribuir a identificar nuevas dianas terapéuticas (Figura 10). Por ello, hemos propuesto una metodología basada en sondas moleculares, que implica el desarrollo de ligandos adecuadamente funcionalizados para identificar todas las proteínas con las que interaccionan mediante espectrometría de masas.

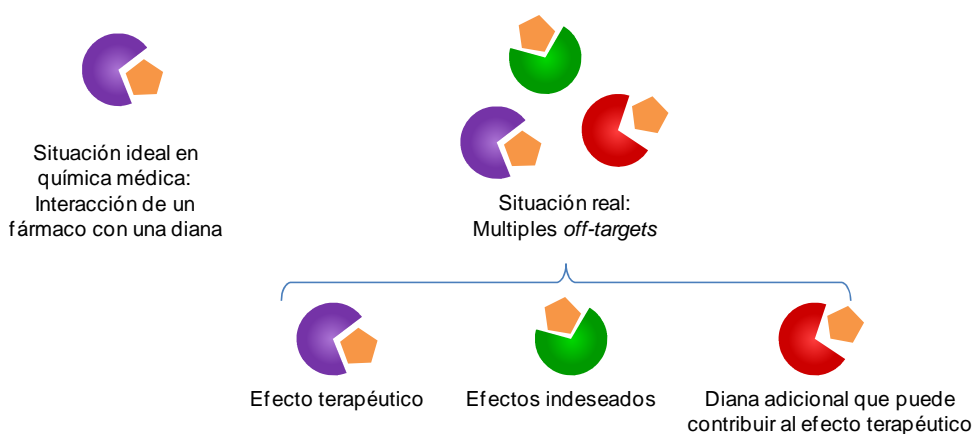


Figura 10. Esquema representativo de los diferentes tipos de *off-targets* para un fármaco.

2.3.1. Diseño de sondas duales

La principal diferencia entre los GPCRs y las enzimas es que estos carecen de un centro activo que se una de forma covalente con el ligando, por lo que este presenta interacciones no covalentes reversibles con el sitio de unión. Por ello el diseño de una sonda de GPCRs para la identificación de proteínas implica un elemento adicional a los anteriormente mencionados, ya que se requiere que la unión sonda-proteína sea covalente e irreversible de modo que sea posible capturar e identificar mediante espectrometría de masas las proteínas a las que se ha unido la sonda. Así, las sondas que hemos diseñado presentan tres elementos principales: (i) una benzofenona como grupo de fotoentrecruzamiento, el cual tras irradiar a la longitud de onda adecuada se une a las proteínas con las que el ligando interacciona; (ii) una subunidad de biotina que permita el enriquecimiento y la identificación de las proteínas de interacción; y (iii) el grupo de unión, que será un ligando del GPCR objeto de estudio (Figura 11). Para poder realizar los experimentos de proteómica la sonda debe mantener afinidad por el GPCR original y por extensión por el resto de *off-targets* o al menos por la mayoría de ellos.

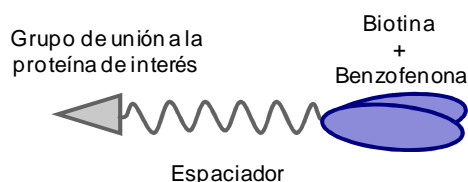


Figura 11. Esquema de una sonda de GPCRs para realizar experimentos de proteómica.

El desarrollo de una plataforma proteómica de GPCRs mediante sondas moleculares conlleva las siguientes etapas: la incubación del proteoma con la sonda, irradiación con luz ultravioleta (UV), enriquecimiento con estreptavidina unida a un soporte sólido, digestión con tripsina de dichas proteínas, separación de los péptidos por cromatografía de líquidos multidimensional y análisis e identificación por espectrometría de masas (LC-MS/MS) (Figura 12).

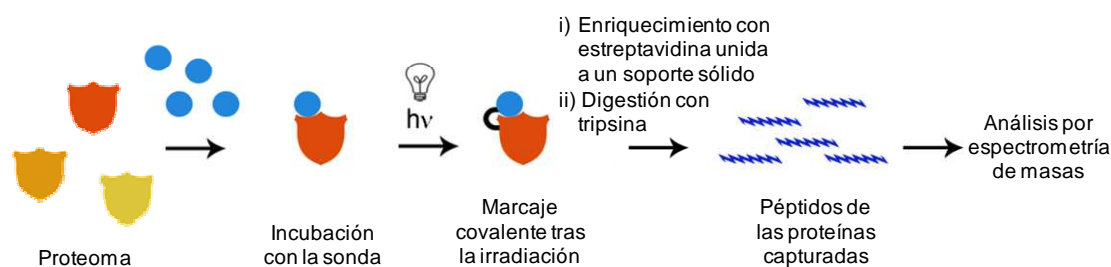


Figura 12. Esquema de la plataforma proteómica.

En el diseño de las sondas duales **61-65** (Figura 13) se han contemplado de nuevo dos posibilidades: (a) sustituir la subunidad aromática de naftaleno del ligando **1** por un sistema de benzofenona [Ar = (3 ó 4)-benzoilfenilo] e introducir la biotina en la biciclohidantoína (compuesto **61**); (b) introducir en la biciclohidantoína del ligando **1** una subunidad de doble marcaje (S. D.) que contiene tanto la benzofenona como la biotina (compuestos **62-65**).

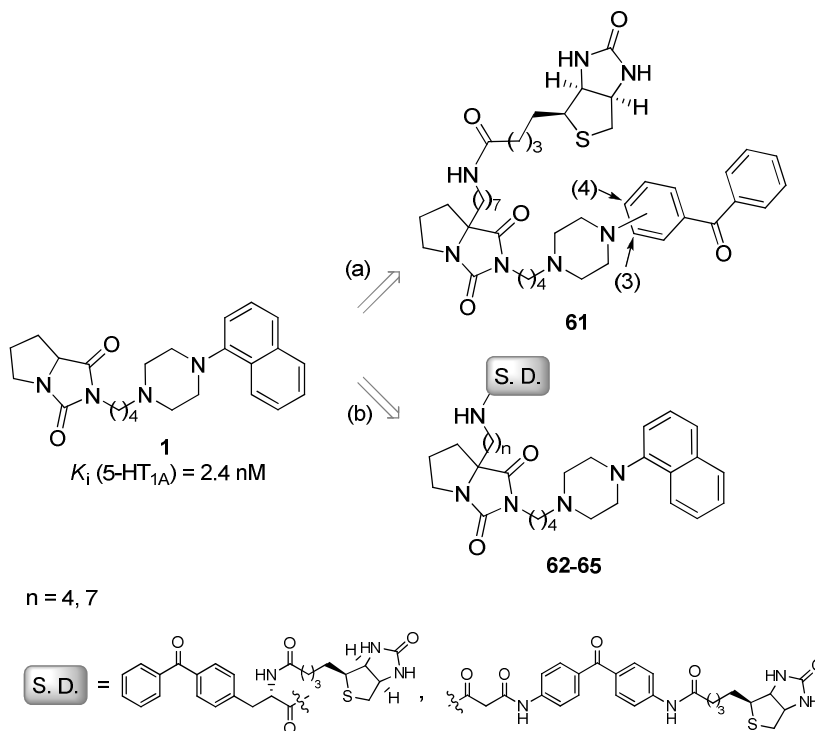
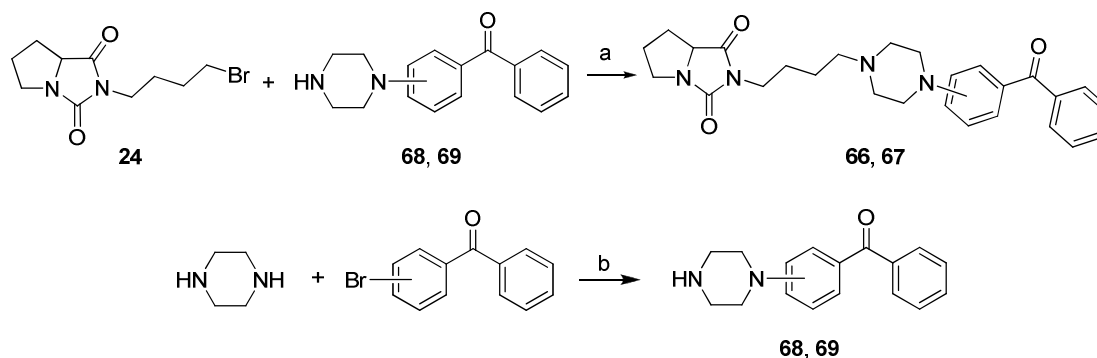


Figura 13. Diseño de las sondas duales **61-65** para desarrollar una plataforma proteómica de GPCRs.

2.3.2. Síntesis

Comenzando con la primera aproximación, previamente a la obtención de la sonda dual **61**, se planteó evaluar la influencia de la benzofenona como subunidad aromática de la arilpiperazina. Para ello se sintetizaron los compuestos **66** y **67**, que no contienen el segundo grupo de marcaje en la biciclohidantoína, por sustitución nucleófila del derivado halogenado **24** con la 3 ó 4-benzoilfenilpiperazina **68** ó **69**. Estas se prepararon por reacción de acoplamiento con paladio de piperazina y los bromoderivados de benzofenona correspondientes (Esquema 7).



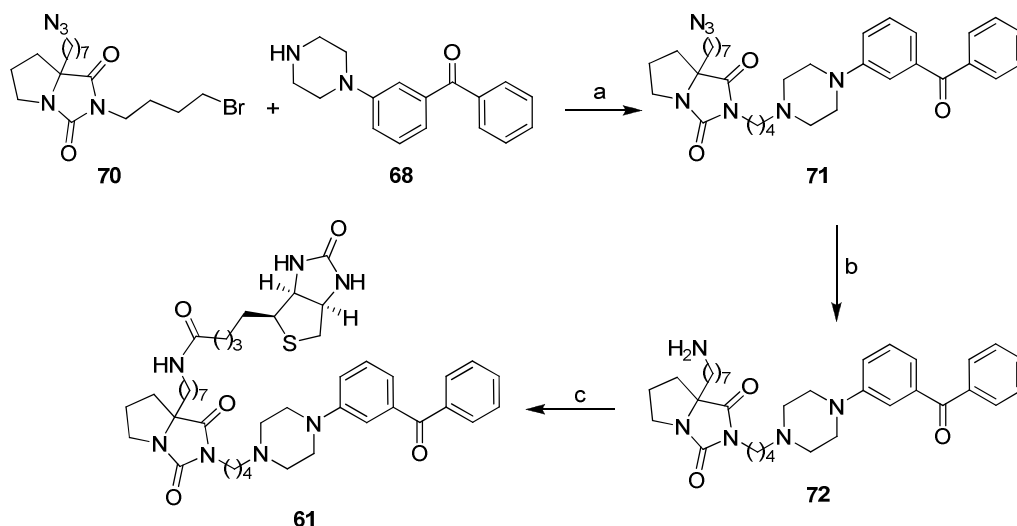
Esquema 7. Reactivos: a) Et_3N , CH_3CN , 60°C , 58-89%; b) $\text{Pd}(\text{AcO})_2$, BINAP, NaO^tBu , tolueno, Δ , 92-98%.

A continuación, se determinó la afinidad de los derivados de benzofenona **66** y **67** por los receptores de serotonina (Tabla 5), observándose que la subunidad aromática de 3-benzoilfenilo mantiene una buena afinidad por el receptor 5-HT_{1A} [K_i (**66**) = 38 nM], mientras que el fragmento de 4-benzoilfenilo da lugar a la pérdida total de afinidad por el receptor [K_i (**67**) > 1000 nM]. Además, el compuesto **66** presenta selectividad frente al resto de los receptores de serotonina ensayados, excepto en el caso del receptor 5-HT_7 . Por tanto, se ha seleccionado el fragmento de 3-benzoilfenilo como subunidad de benzofenona para la sonda dual **61**. Su síntesis se llevó a cabo a partir de la bromoazida **70**, por sustitución nucleófila con la piperazina **68**, seguido de la reducción de la azida **71** y la posterior condensación de la amina obtenida **72** con biotina (Esquema 8).

Tabla 5. Afinidades de los derivados de benzofenona **66** y **67** por el receptor 5-HT_{1A} y perfil de selectividad frente a otros receptores de serotonina.

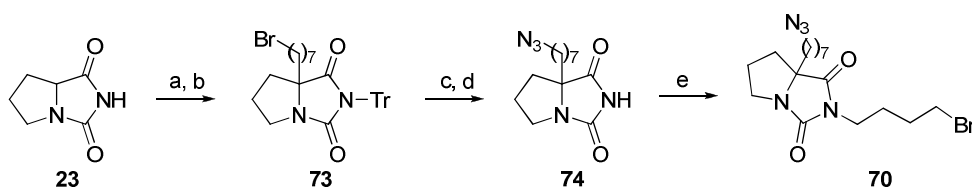
Comp.	Ar	$K_i \pm \text{E. E.}^a$ (nM)				
		5-HT _{1A}	5-HT _{2A}	5-HT _{5A}	5-HT ₆	5-HT ₇
66		38 ± 9	>1000	>1000	>1000	74 ± 25
67		>1000	ND	ND	ND	ND

^a Los valores obtenidos corresponden a la media y el error estándar (E. E.) de dos a cuatro experimentos individuales realizados por triplicado.



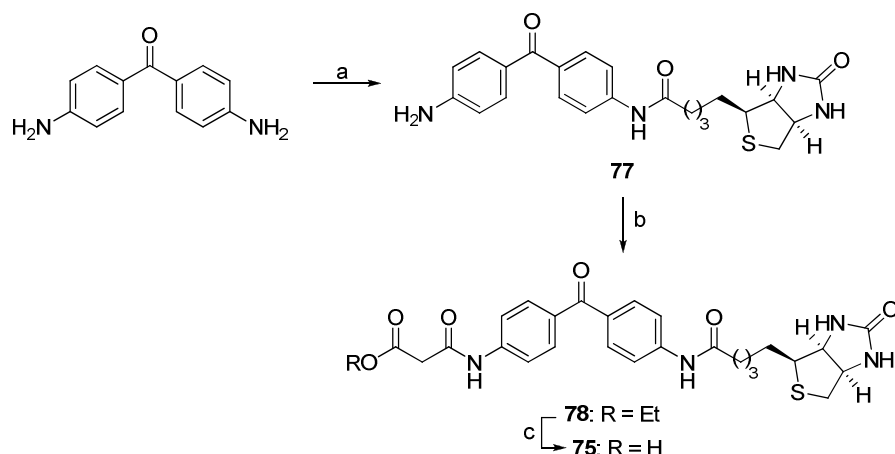
Esquema 8. Reactivos: a) Et_3N , CH_3CN , 60 °C, 79%; b) PPh_3 , $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1), t.a., 84%; c) biotina, EDC, HOBt, DMF , CH_2Cl_2 , t.a., 53%.

El derivado halogenado **70** se obtuvo de manera análoga a **56** (véase Esquema 6) a partir de la biciclohidantoína **23**, mediante protección con cloruro de tritilo, alquilación en el carbono cabeza de puente, sustitución nucleófila del derivado halogenado **73** con azida sódica, desprotección y posterior *N*-alquilación de **74** con 1,4-dibromobutano en presencia de hidruro sódico (Esquema 9).



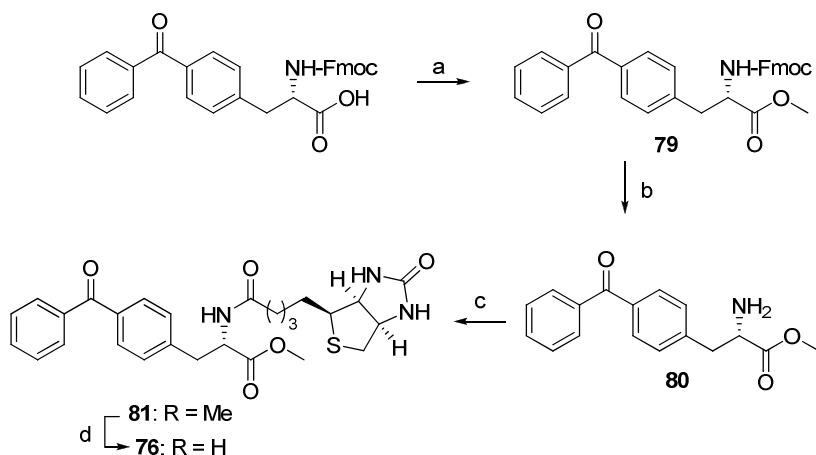
Esquema 9. Reactivos: a) NaH , Tr-Cl , DMF , 60 °C, 96%; b) i. LDA , THF , 0 °C, ii. 1,7-dibromoheptano, t.a., 75%; c) NaN_3 , DMF , H_2O , 50 °C, 99%; d) TFA , CH_2Cl_2 , t.a., 89%; e) NaH , 1,4-dibromobutano, DMF , 110 °C, 70%.

Para obtener los compuestos **62-65**, marcados con benzofenona y biotina en el carbono cabeza de puente de la biciclohidantoína, se han preparado previamente las subunidades de doble marcaje **75** y **76** funcionalizadas con un ácido carboxílico, las cuales se incorporarán a la molécula por acoplamiento con la amina correspondiente. La subunidad de doble marcaje **75** se sintetizó a partir de 4,4'-diaminobenzofenona, por acoplamiento con biotina, seguido del tratamiento de la amina **77**⁸⁹ con monomalonato de etilo y posterior hidrólisis del éster etílico **78** en medio básico (Esquema 10).



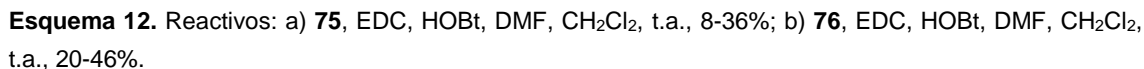
Esquema 10. Reactivos: a) biotina, DCC, HOBT, DMAP, DMF, CH_2Cl_2 , t.a., 97%; b) ácido 3-etoxi-3-oxopropanoico, EDC, HOBT, DMF, CH_2Cl_2 , t.a., 90%; c) NaOH 1 M, MeOH, t.a., 60%.

La síntesis de la subunidad de doble marcaje **76** se llevó a cabo a partir del aminoácido *p*-benzoil-L-fenilalanina protegido con el grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), mediante esterificación con yoduro de metilo, seguido de la desprotección del grupo amino de **79**, condensación de la amina **80**⁹⁰ con biotina y posterior hidrólisis del éster metílico **81** en medio básico (Esquema 11).



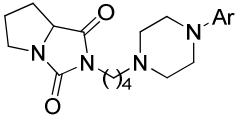
Esquema 11. Reactivos: a) K_2CO_3 , CH_3I , DMF, 0 °C, 90%; b) piperidina, CH_2Cl_2 , t.a., 77%; c) biotina, EDC, HOBT, DMF, CH_2Cl_2 , t.a., 63%; d) $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, THF, H_2O , t.a., 80%.

Los compuestos marcados con benzofenona y biotina **62-65**, se obtuvieron por acoplamiento de las aminas intermedias **38** y **39** con las subunidades de doble marcaje **75** y **76**, en presencia de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) (Esquema 12).

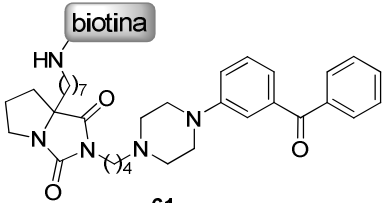


En primer lugar, se llevó a cabo la determinación de la afinidad de las sondas duales sintetizadas **61-65** por el receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}, así como su selectividad por los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{5A}, 5-HT₆ y 5-HT₇ (Tabla 6). Con respecto al receptor 5-HT_{1A}, se puede observar que todos los compuestos mantienen una elevada afinidad ($K_i = 1.1-76$ nM), a pesar del gran tamaño de la subunidad de doble marcaje en los compuestos **62-65**. Además, las sondas sintetizadas mantienen el perfil de selectividad de su precursor no marcado. Cabe señalar que la incorporación de ambas subunidades de marcaje en el carbono cabeza de puente de la biciclohidantoína como único punto de funcionalización (**62-65**) es más favorable para la afinidad por el receptor 5-HT_{1A} que cuando se sustituye el anillo aromático por benzofenona [K_i (**64**) = 1.1 nM vs K_i (**61**) = 76 nM]. A la vista de los datos de afinidad, se ha seleccionado la sonda **64** ($K_i = 1.1$ nM) para desarrollar una plataforma proteómica.

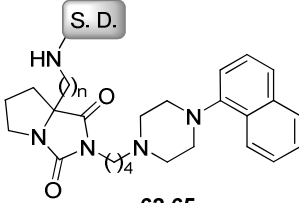
Tabla 6. Afinidades de los compuestos con doble marcaje **61-65** por el receptor 5-HT_{1A}.



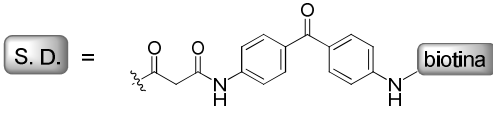
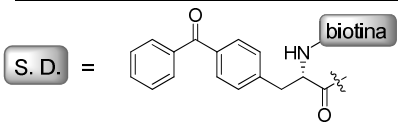
1: Ar = 1-naftilo
66: Ar = 3-benzofenilo



61



62-65

Comp.	n	$K_i \pm E. E.^a$ (nM)				
		5-HT _{1A}	5-HT _{2A}	5-HT _{5A}	5-HT ₆	5-HT ₇
1	-	2.4 ± 0.1	30 ± 13	>1000	>1000	8 ± 1
66	-	38 ± 9	>1000	>1000	>1000	74 ± 25
61	-	76 ± 5	>1000	>1000	>1000	30 ± 5
<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-right: 5px;">S. D.</div> <div style="margin: 0 10px;">=</div>  </div>						
62	4	2.7 ± 0.3	3.1 ± 0.1	>1000	>1000	9 ± 2
63	7	4 ± 1	3.5 ± 0.1	>1000	>1000	21.6 ± 0.6
<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-right: 5px;">S. D.</div> <div style="margin: 0 10px;">=</div>  </div>						
64	4	1.1 ± 0.5	41 ± 3	54 ± 30	>1000	0.92 ± 0.06
65	7	5 ± 2	34 ± 2	200 ± 115	>1000	5.0 ± 0.1

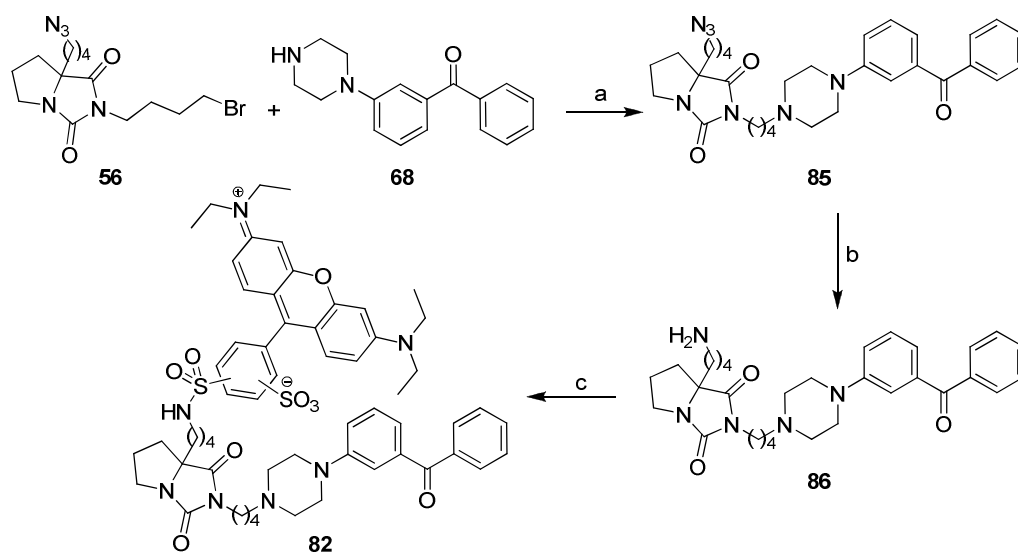
^a Los valores obtenidos corresponden a la media y el error estándar (E. E.) de dos a cuatro experimentos individuales realizados por triplicado.

2.3.4. Detección de proteínas de membranas celulares en gel de poliacrilamida

Antes de poner a punto la plataforma proteómica, es necesario confirmar que los compuestos diseñados son realmente capaces de marcar proteínas de una manera específica, es decir, el marcaje debe ser dependiente de la concentración de sonda y del tiempo de irradiación. Para realizar estas confirmaciones ha sido necesario sintetizar sondas duales fluorescentes equivalentes a las sondas duales marcadas con biotina, que nos permitan

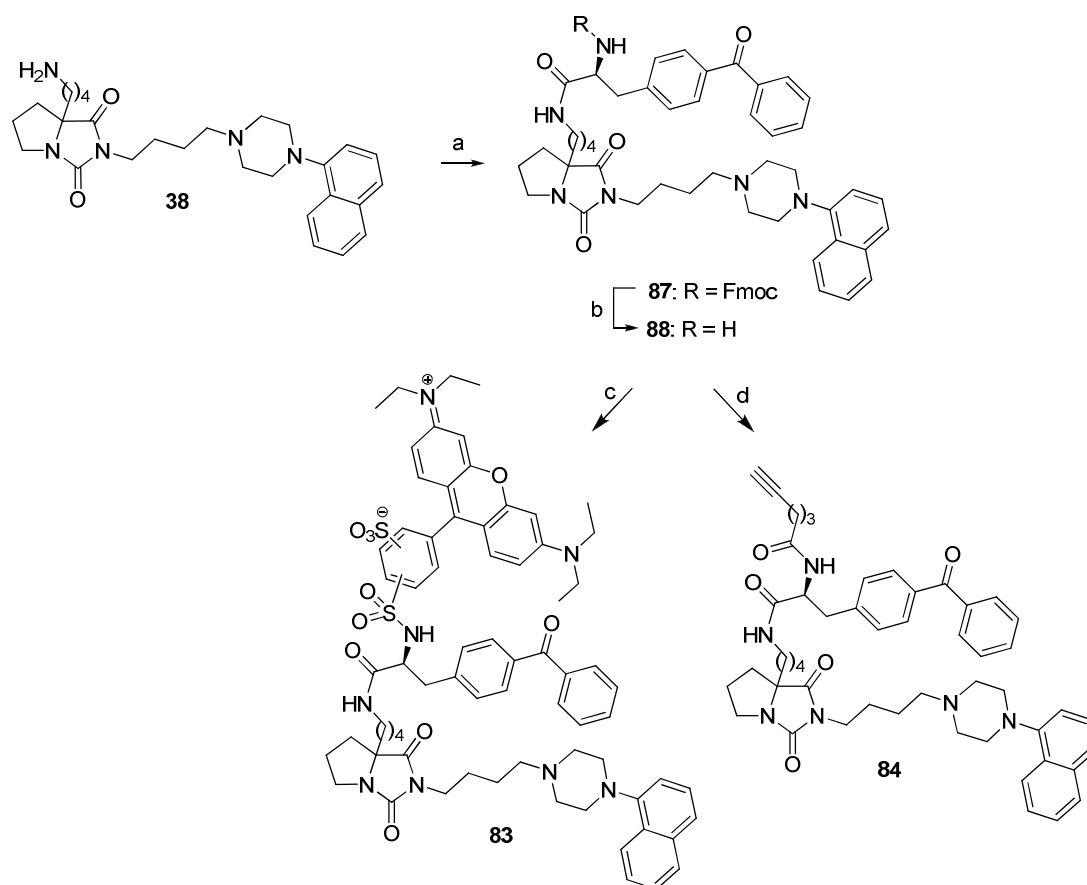
visualizar el marcaje en gel de poliacrilamida (1D SDS-PAGE). Por lo tanto se han sintetizado los compuestos fluorescentes **82** y **83** (Tabla 7), donde la biotina ha sido sustituida por el fluoróforo lisamina. Además, se ha preparado el ligando marcado **84** (Tabla 7) en el que la subunidad de biotina se ha sustituido por un alquino terminal con objeto de explorar la versatilidad de este tipo de sonda dual en sistemas biológicos.

La síntesis de **82** se llevó a cabo de manera análoga a la de **61**, a partir de la bromoazida **56**, por sustitución nucleófila con la piperazina **68**, seguido de la reducción de la azida **85** y la posterior condensación de la amina obtenida **86** con cloruro de lisamina (Esquema 13).



Esquema 13. Reactivos: a) Et_3N , CH_3CN , $60\text{ }^\circ\text{C}$, 85%; b) PPh_3 , $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1), t.a., 66%; c) lisamina-Cl, Et_3N , THF, t.a., 40%.

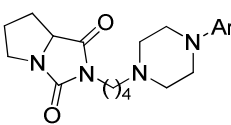
Por otra parte, los compuestos marcados con benzofenona y lisamina o alquino **83** y **84** se obtuvieron a partir de la amina **38** por acoplamiento con el aminoácido *p*-benzoil-L-fenilalanina convenientemente protegido con Fmoc, seguido de la desprotección del grupo amino con piperidina y posterior condensación de la amina obtenida **88** con cloruro de lisamina o con ácido 5-hexinoico (Esquema 14).



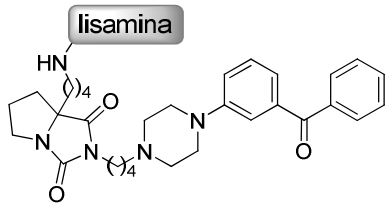
Esquema 14. Reactivos: a) Fmoc-*p*-benzoil-L-fenilalanina, EDC, HOBT, DMF, CH₂Cl₂, t.a., 80%; b) piperidina, CH₂Cl₂, t.a., 75%; c) lisamina-Cl, Et₃N, THF, t.a., 10%; d) ácido 5-hexinoico, DCC, DMAP, CH₂Cl₂, t.a., 53%.

Al igual que se ha hecho con las sondas duales biotiniladas, antes de utilizar las nuevas sondas duales fluorescentes en análisis por SDS-PAGE, se ha determinado su afinidad por el receptor 5-HT_{1A} y su selectividad frente a un panel de receptores de la misma familia (Tabla 7).

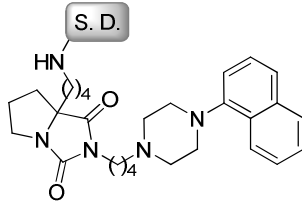
Tabla 7. Afinidades de los compuestos con doble marcaje **82-84** por el receptor 5-HT_{1A}.



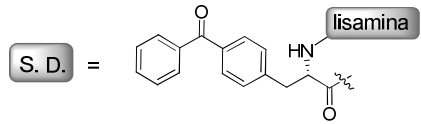
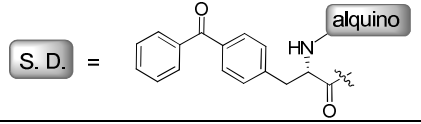
1: Ar = 1-naftilo
66: Ar = 3-benzoilfenilo



82



83, 84

Comp.	$K_i \pm E. E.^a$ (nM)				
	5-HT _{1A}	5-HT _{2A}	5-HT _{5A}	5-HT ₆	5-HT ₇
1	2.4 ± 0.1	30 ± 13	>1000	>1000	8 ± 1
66	38 ± 9	>1000	>1000	>1000	74 ± 25
82	28 ± 7	>1000	>1000	>1000	29 ± 3
					
83	22 ± 6	22 ± 12	450 ± 250	>1000	17 ± 10
					
84	5 ± 1	37 ± 1	230 ± 150	125 ± 6	5.1 ± 0.1

^a Los valores obtenidos corresponden a la media y el error estándar (E. E.) de dos a cuatro experimentos individuales realizados por triplicado.

Una vez comprobado que las nuevas sondas duales marcadas con lisamina y benzofenona **82** ($K_i = 28$ nM) y **83** ($K_i = 22$ nM) mantienen afinidad por el receptor 5-HT_{1A} en el rango nanomolar (Tabla 7), se han utilizado con objeto de detectar las proteínas marcadas. Así, los compuestos (5 μM) se incubaron durante 30 min con un homogeneizado de membranas de células HEK-293-EBNA transfectadas con el receptor humano 5-HT_{1A} (25 μg proteína/carril) y se irradiaron con luz UV ($\lambda = 360$ nm) para inducir el fotoentrecruzamiento. A continuación, las muestras se separaron mediante gel de poliacrilamida (1D SDS-PAGE) y se visualizaron en un escáner de fluorescencia (Figura 14).

En las Figuras 14A y 14D se puede observar la capacidad de las sondas **82** y **83**, respectivamente, para marcar, entre otras, al menos una proteína con un peso molecular de ~47 kDa, que coincide con el peso molecular del receptor 5-HT_{1A} (46.8 kDa).

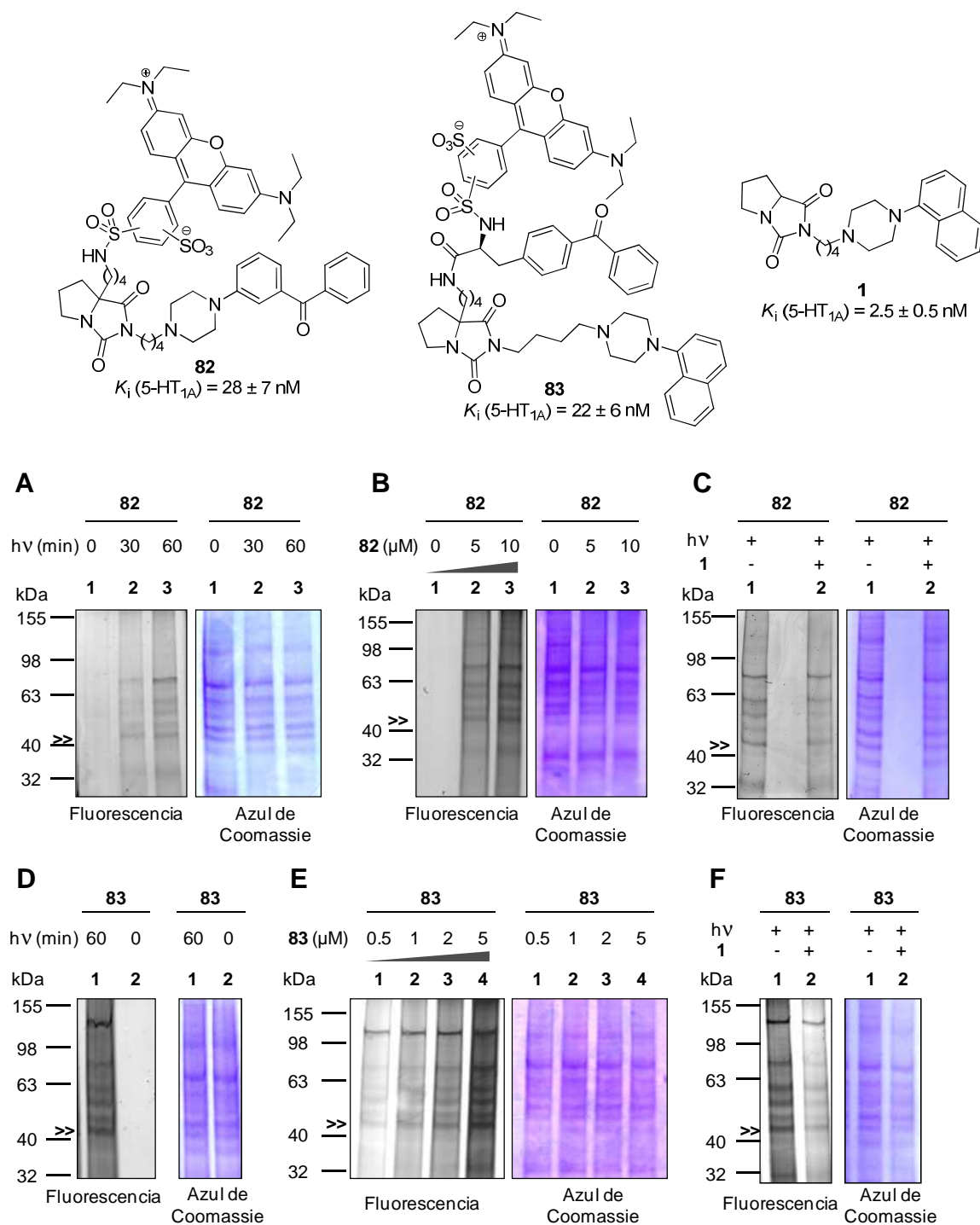


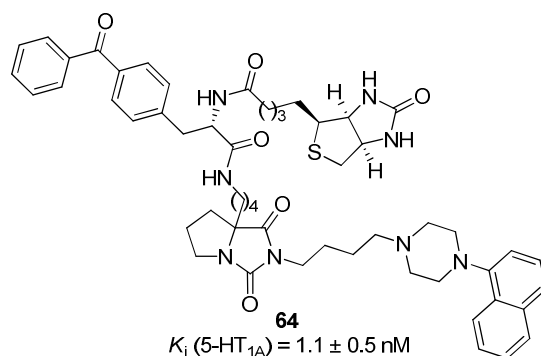
Figura 14. Marcaje de proteínas de membranas HEK-293-EBNA transfectadas con el receptor 5-HT_{1A} con las sondas duales **82** y **83**. (A) Marcaje dependiente del tiempo de irradiación con la sonda **82** (5 μM) ó (D) **83** (5 μM). (B) y (E) Marcaje dependiente de la concentración de sonda. (C) y (F) Unión inespecífica tras el desplazamiento de la sonda con un exceso del ligando no marcado **1** (500 μM).

Además, se puede afirmar que se ha generado un enlace covalente entre la sonda y el proteoma debido a la irradiación, ya que no se observa fluorescencia en ausencia de irradiación (Figura 14A carril 1 y 14D carril 2) y se aprecia un aumento de la intensidad de fluorescencia con el tiempo de irradiación (Figura 14A, carriles 2 y 3), siendo 60 min el tiempo óptimo. La tinción con azul de Coomassie revela la existencia de la misma cantidad de proteína en los tres carriles de la Figura 14A y en los dos carriles de la Figura 14D, lo que indica que la diferencia en la intensidad del marcaje se debe únicamente al tiempo de irradiación. Asimismo, podemos observar en las Figuras 14B y 14E que la intensidad de fluorescencia aumenta con la concentración de las sondas **82** y **83**, lo que significa que el marcaje es dependiente de la concentración de sonda en ambos casos.

Con el fin de determinar la especificidad del marcaje, se ha llevado a cabo el mismo experimento en presencia de un exceso del ligando no marcado **1** (Figuras 14C y 14F, carril 2), observándose un descenso en la fluorescencia de las proteínas marcadas, lo que indica un desplazamiento de la sonda fluorescente por el ligando no marcado.

2.3.5. Identificación del perfil de proteínas marcadas mediante espectrometría de masas

Una vez comprobado que las sondas duales marcadas con benzofenona y lisamina **82** y **83** son capaces de unirse a proteínas de forma específica, se continuó con el desarrollo de la plataforma proteómica para identificar las diversas proteínas a las cuales se unen los ligandos sintetizados. Para aislar las proteínas unidas a los ligandos nos hemos basado en la afinidad biotina-estreptavidina y su identificación la llevaremos a cabo mediante el análisis por LC-MS/MS. Como prueba de concepto, hemos utilizado membranas HEK-293-EBNA transfectadas con el receptor 5-HT_{1A} como proteoma, ya que este sistema modelo nos permitirá identificar la diana original de la sonda, el receptor 5-HT_{1A}, y por tanto proporcionará la primera validación de esta aproximación. En este experimento se requieren sondas marcadas con benzofenona y biotina, entre las que se ha seleccionado el compuesto **64**, por su elevada afinidad por el receptor 5-HT_{1A} ($K_i = 1.1$ nM, Tabla 6). La sonda **64** (5 μ M) se incubó con el proteoma durante 30 min y se irradió con luz UV durante 60 min para generar enlaces covalentes entre la sonda y las proteínas marcadas, que posteriormente se aislaron del resto del proteoma empleando estreptavidina unida a un soporte sólido (véase Figura 12). Finalmente se realizó una digestión con tripsina de las proteínas marcadas y los péptidos resultantes fueron analizados por LC-MS/MS en colaboración con el Dr. Juan Antonio López del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III. Para comprobar la especificidad del marcaje, se llevó a cabo el mismo experimento tanto en ausencia de sonda, como en presencia de un exceso del ligando no marcado **1** para desplazar la sonda de su sitio de unión antes de la irradiación. En la Tabla 8 se detallan las proteínas identificadas de manera específica con esta metodología en células transfectadas, empleando los códigos de la base de datos *Swiss Protein* (<http://www.uniprot.org>).

Tabla 8. Proteínas identificadas de forma específica en los experimentos de proteómica con la sonda **64** en células HEK-293-EBNA transfectadas con el receptor 5-HT_{1A}.^a

Nombre	Código de Swiss Prot
Receptor de serotonina 5-HT _{1A}	P08908
<i>Heat Shock Protein</i> de 60 kDa mitocondrial (Hsp60)	P10809
<i>Titin isoform N2-A</i> (TTN)	A2TKE6
<i>Actin 1</i> , citoplasmática (ACTB)	P60709
<i>Trifunctional enzyme subunit alpha</i> , mitocondrial (HADHA)	P40939
<i>Heat Shock Protein</i> de 70 kDa (Hsp70)	P08107
<i>Poly [ADP-ribose] polymerase 1</i> (PARP1)	P09874
<i>Calnexin</i> (CANX)	B4DGP8
<i>Trifunctional enzyme subunit beta</i> , mitocondrial (HADHB)	P55084
<i>Voltage-dependent anion-selective channel protein 2</i> (VDAC2)	P45880
<i>Tubulin alpha-1B chain</i> (TUBA1B)	P68363
<i>Propionyl-CoA carboxylase alpha chain</i> , mitocondrial (PCCA)	B4DPF9
<i>Prohibitin</i> (PHB)	P35232
<i>Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase</i> (RPN1)	P04843
<i>ADP/ATP translocase 2</i>	P05141
<i>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1</i> (ATP1A1)	P05023
<i>3-Hydroxyacyl-CoA dehydratase 3</i>	Q9P035
<i>Isoform 1 of Centromere-associated protein E</i>	Q02224
<i>ATP synthase subunit beta</i> , mitocondrial (ATP5B)	P06576
<i>ATP-binding cassette sub-family D member 3</i> (ABCD3)	P28288
<i>Endoplasmin</i>	P14625
<i>Lamin-B1</i>	P20700
<i>Elongation factor Tu</i> , mitocondrial	P49411
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</i>	P61978
<i>Peroxisome oxidoreductase 1</i>	Q06830
<i>Ornithine aminotransferase</i> , mitocondrial	P04181
<i>Heat shock protein</i> de 75 kDa mitocondrial (Hsp75)	Q12931
<i>ATP synthase subunit alpha</i> , mitocondrial (ATP5A1)	P25705
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M</i>	P52272
<i>Peroxisomal multifunctional enzyme type 2</i>	P51659
<i>Stress-70 protein</i> , mitocondrial	P38646

^a Proteínas identificadas en cuatro experimentos individuales y no observadas en los controles con DMSO o con un exceso de ligando **1**.

El análisis de los resultados de proteómica indica que en todas las muestras incubadas con la sonda **64** se ha identificado el receptor de serotonina 5-HT_{1A}. Por el contrario, en ninguno de los controles realizados para determinar la especificidad del marcaje –en ausencia de sonda y en presencia de un exceso del ligando **1**– se identificó el receptor 5-HT_{1A} entre las proteínas detectadas, lo que indica que esta metodología es válida para aislar e identificar las proteínas con las que la sonda interacciona de forma específica. Además de su diana original se han identificado diversos *hits*, entre los que destacan las *Heat Shock Proteins* de 60 y 70 kDa (Hsp60 y Hsp70) debido a su implicación en cáncer.^{20,91} En este sentido, estudios recientes han demostrado que el fármaco antitumoral sorafenib (Nexavar®) –un conocido inhibidor de quinasas– tiene afinidad por los receptores de serotonina⁹² y se ha propuesto una relación entre los receptores de serotonina, en particular del receptor 5-HT_{1A}, y algunos tipos de cáncer, como el cáncer de próstata.⁹³ Además, se ha observado la existencia de comorbilidad inversa entre neurodegeneración y cáncer, lo que pone de manifiesto que algunas enfermedades del SNC están asociadas a un menor riesgo de padecer cáncer.⁹⁴ Aunque aún no está claro el mecanismo de acción de los receptores de serotonina y sus ligandos en cáncer, los resultados obtenidos en esta área sugieren que las indicaciones terapéuticas asociadas al sistema serotoninérgico pueden ir más allá que las relacionadas con el SNC y este potencial podría explorarse con sondas moleculares.

2.3.6. Validación de las proteínas identificadas. Nuevas dianas terapéuticas

Una vez identificadas las proteínas con las que interacciona la sonda, es necesario validar la especificidad de la unión de las proteínas a la sonda **64**, es decir, hay que confirmar que la sonda es capaz de marcar las proteínas de forma dependiente de la concentración y que compite con el ligando no marcado en el sitio de unión de la proteína. Para ello se ha seleccionado la proteína Hsp60 y se ha utilizado la sonda dual **83** ($K_i = 22$ nM, Tabla 7), en la que el segundo grupo de marcaje es lisamina en lugar de biotina, con el fin de visualizar la proteína unida a la sonda por fluorescencia, una vez separada en gel de poliacrilamida.

Así, un homogeneizado de la proteína Hsp60 pura se incubó durante 30 min con distintas concentraciones de la sonda **83** en el intervalo de 0.5 μ M a 5 μ M y se irradió con luz UV ($\lambda = 360$ nm) para inducir el fotoentrecruzamiento. A continuación, las muestras se separaron mediante 1D SDS-PAGE y se visualizaron en un escáner de fluorescencia (Figura 15). En la Figura 15A se puede observar que la intensidad de fluorescencia es dependiente de la concentración de sonda, siendo 2 μ M la concentración óptima para el marcaje. Con el fin de determinar la especificidad del marcaje, se ha llevado a cabo el mismo experimento en presencia de un exceso del ligando no marcado **1** (Figura 15B), observándose un descenso en la fluorescencia de la banda correspondiente a Hsp60. Estos resultados

permiten confirmar que las sondas basadas en ligandos del receptor 5-HT_{1A} reconocen a la proteína Hsp60.

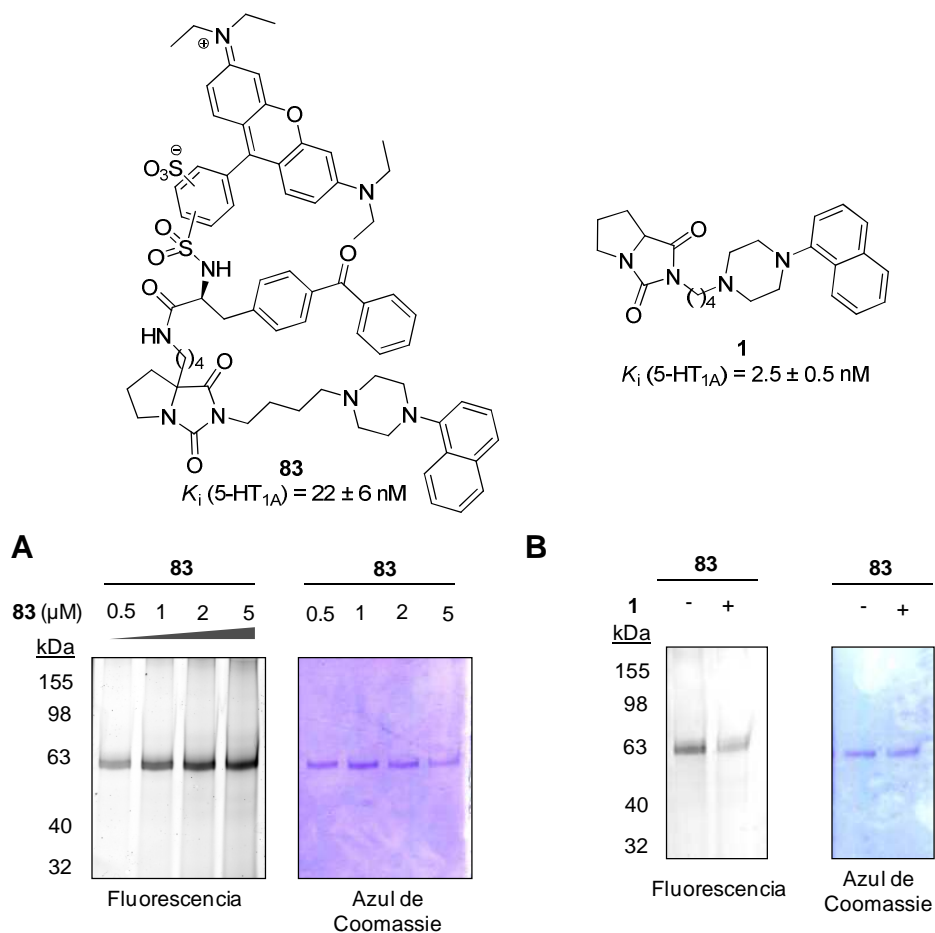
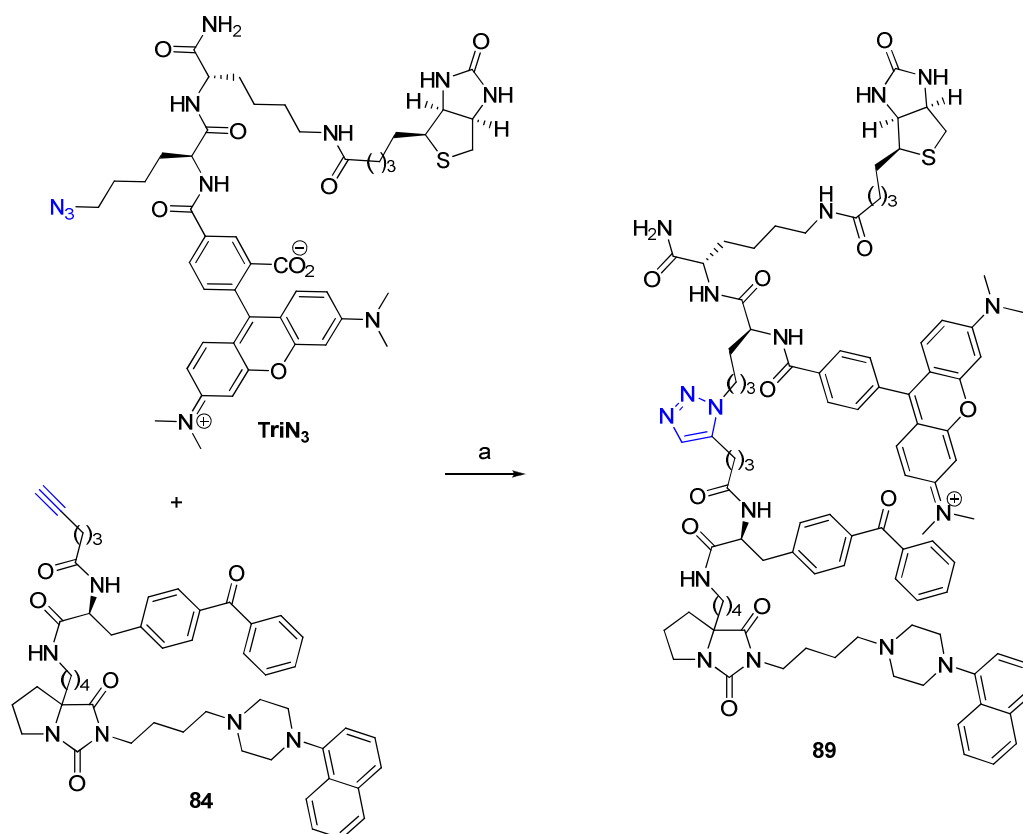


Figura 15. Marcage de la proteína Hsp60 con la sonda dual **83**. (A) Marcage dependiente de la concentración de sonda (0.5-5 μM). (B) Unión inespecífica tras el desplazamiento de la sonda con un exceso del ligando no marcado **1** (200 μM).

Por otra parte, y con objeto de explorar la versatilidad del empleo de sondas moleculares, se ha utilizado el compuesto **84** ($K_i = 5 \text{ nM}$, Tabla 7), con benzofenona y un alquino terminal como subunidades de marcaje, para comprobar si también es capaz de marcar la proteína Hsp60. Esta sonda se podría emplear en sistemas de mayor complejidad, ya que se puede introducir la subunidad fluorescente con posterioridad a la incubación e irradiación mediante una reacción de química clic. En este caso es necesario disponer de una segunda sonda funcionalizada con azida, que reaccionará con el alquino terminal y permitirá visualizar la unión de la sonda a la proteína. Como sonda secundaria se ha elegido el compuesto TriN_3 ⁹⁵ (Esquema 15) que contiene un fluoróforo y una subunidad de biotina por lo que podría utilizarse

tanto en experimentos de visualización en geles de poliacrilamida, como en experimentos de proteómica para identificar las proteínas con las que interacciona la sonda.

En primer lugar se optimizó la reacción de química clic entre la sonda **84** y TriN_3 en disolución con el fin de determinar las condiciones experimentales más adecuadas para llevar a cabo la reacción. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se hizo reaccionar la sonda **84** ($10\ \mu\text{M}$) con TriN_3 ($100\ \mu\text{M}$), en presencia de CuSO_4 , ascorbato monosódico y tris[(1-bencil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina (TBTA) en el tampón de incubación durante 60 min a temperatura ambiente (Esquema 15). El análisis por espectrometría de masas del crudo de reacción permitió identificar el ion molecular correspondiente al producto de cicloadición **89**, confirmándose que la reacción ha tenido lugar.



Esquema 15. Reactivos: a) CuSO_4 , ascorbato monosódico, TBTA, t.a.

A continuación, se llevó a cabo la reacción de química clic en presencia de la proteína Hsp60. Para ello, un homogeneizado de la proteína pura se incubó durante 30 min con la sonda **84** ($10\ \mu\text{M}$) y se irradió a 360 nm durante 60 min. Sobre el proteoma ya marcado, se añadió la sonda secundaria TriN_3 ($100\ \mu\text{M}$), CuSO_4 ($1\ \text{mM}$), ascorbato monosódico ($50\ \mu\text{M}$), y

TBTA (100 μ M), y se incubó durante 60 min. Finalmente, las proteínas se separaron por electroforesis y se visualizaron en un escáner de fluorescencia. En la Figura 16 se puede observar que la intensidad de fluorescencia de la banda correspondiente a la proteína Hsp60 marcada con la sonda **84** es elevada y que el desplazamiento con un exceso del ligando no marcado **1** proporciona una intensidad similar a la que se obtiene en ausencia de la sonda. El marcaje residual que se observa en los dos últimos casos puede ser debido a una pequeña contribución de unión inespecífica de TriN₃ a la proteína.

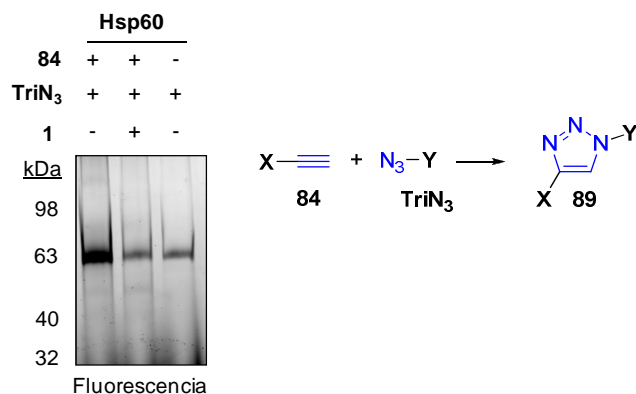


Figura 16. Marcaje de la proteína Hsp60 con la sonda dual **84** mediante química clic (carril 1), desplazamiento de dicho marcaje en presencia de un exceso del ligando no marcado **1** (500 μ M) (carril 2), marcaje inespecífico en ausencia de sonda **84** (carril 3).

Estos resultados confirman que las sondas desarrolladas son capaces no solo de interaccionar con el receptor para el que fueron inicialmente diseñadas, sino que además pueden contribuir a la identificación de otras dianas.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral avalan el empleo de sondas para GPCRs dirigido a la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas. Actualmente se están llevando a cabo experimentos para extender esta metodología a sistemas nativos y así poder identificar tanto proteínas que interaccionan con el receptor de serotonina 5-HT_{1A} (*scaffold proteins*), como *off-target proteins* que podrían convertirse en nuevas dianas terapéuticas.

PARTE EXPERIMENTAL

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Síntesis

Todos los productos de partida, reactivos y disolventes se han adquirido con alto grado de pureza en Sigma-Aldrich, Acros, ABCR, Scharlab y Panreac. La trietilamina se secó sobre CaH_2 y se destiló antes de su utilización. El diclorometano se utilizó recién destilado sobre NaH. El THF y el éter etílico se destilaron sobre Na con benzofenona inmediatamente antes de su uso. La determinación de la concentración de la disolución comercial de *n*-BuLi en THF se ha llevado a cabo mediante valoración con ácido difenilacético.

Las reacciones en microondas se han realizado en un reactor Biotage Initiator 2.5. La cromatografía en capa fina (c.c.f.) se ha llevado a cabo en cromatofolios de gel de sílice de Merck (Kieselgel 60F-254) y detección con luz UV, disolución etanólica al 5% de ninhidrina o disolución etanólica al 10% de ácido fosfomolibdico. La cromatografía en columna se realizó bien de forma manual utilizando gel de sílice tipo 60 de Merck (tamaño de grano 230-400 mesh ASTM) o bien en un equipo de cromatografía flash Varian 971-FP con cartuchos de gel de sílice (Varian, tamaño de partícula de 50 μm).

Los puntos de fusión (p.f.) se han determinado en un aparato Stuart-Scientific, en capilares abiertos y no se han corregido. La rotación óptica $[\alpha]$ se ha medido en un polarímetro Perkin Elmer 241 usando una lámpara de sodio ($\lambda = 589 \text{ nm}$) con paso óptico de 1 dm; las concentraciones se expresan en g/100 mL. Los espectros de IR se han registrado en un espectrofotómetro Bruker Tensor 27 con un rango de transmisión de 5200-650 cm^{-1} equipado con un accesorio ATR specac para la medida de la reflectancia total atenuada (ATR) y las frecuencias se expresan en cm^{-1} . Los espectros de ^1H - y ^{13}C -RMN se han obtenido en el Centro de Asistencia a la Investigación (CAI) de RMN de la Universidad Complutense de Madrid

(UCM) y se han registrado a temperatura ambiente en los espectrómetros “Bruker Avance 700” (^1H , 700 MHz; ^{13}C , 175 MHz), “Bruker Avance 500” (^1H , 500 MHz; ^{13}C , 125 MHz) o “Bruker Avance 300-AM” (^1H , 300 MHz; ^{13}C , 75 MHz). Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) utilizando tetrametilsilano como referencia interna y las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hertzios (Hz). En la descripción de las señales de RMN se han empleado las siguientes abreviaturas: s (singlete), d (doblete), t (triplete), q (cuadruplete), m (multiplete), a (ancho), ap (aparente), cic (ciclo), pip (piperazina), Ar (aromático), naft (naftilo), lis (lisamina), benzf (benzofenona) y Ph (fenilo). Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se han llevado a cabo en un espectrómetro FTMS Bruker APEX Q IV utilizando la técnica de ionización por electrospray (ESI) en el CAI de EM de la UCM. El análisis de cromatografía de líquidos de alta eficacia acoplado a espectrometría de masas (HPLC-MS) se ha llevado a cabo en un espectrómetro Agilent 1200LC-MSD VL, la separación se ha realizado con una columna Eclipse XDB-C18 (5 μm , 4.6 mm x 15.0 mm) y la fase móvil empleada consiste en un gradiente de A (agua/metanol 95:5) y B (agua/metanol 5:95) con un 0.1% de hidróxido amónico y 0.1% de ácido fórmico como aditivos. Se ha utilizado un flujo de 0.5 mL/min y los gradientes indicados en la Tabla 10. Los espectros de masas se han llevado a cabo utilizando la técnica ESI. Los picos correspondientes al ion molecular más una unidad o más 23 unidades se indican como $[\text{M}+\text{H}]^+$ o $[\text{M}+\text{Na}]^+$, respectivamente. Los datos de análisis elemental cuantitativo (C, H, N, S) se han obtenido en un instrumento LECO CHNS-932 en el CAI de Microanálisis Elemental de la UCM (véase Tabla 11).

Tabla 10. Gradientes de HPLC utilizados en la caracterización de los compuestos sintetizados.

Gradiente-I		Gradiente-II		Gradiente-III		Gradiente-IV	
t (min)	% de B	t (min)	% de B	t (min)	% de B	t (min)	% de B
0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	2	0	5	0	5	0
10	50	8	60	20	100	35	100
20	100	20	100	25	100	50	100
25	100	25	100	30	0	60	0
30	0	30	0				

El nombre IUPAC de la biotina es ácido [5-(3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d'*]-imidazol-4-il]pentanoico; sin embargo, a lo largo de esta memoria, se ha nombrado su radical acilo con el nombre vulgar admitido de biotinil. De igual manera, el nombre IUPAC de la lisamina es mezcla de ácido 4-[3-(dietilamino)-6-(dietiliminio)-3*H*-xanten-9-il]-4-sulfonilbenceno-sulfónico y ácido 2-[3-(dietilamino)-6-(dietiliminio)-3*H*-xanten-9-il]-5-sulfonilbencenosulfónico; sin embargo, se ha nombrado su radical con el nombre vulgar de lisaminil, con el fin de reducir la complejidad de los nombres de los compuestos con estas subunidades.

En todos los casos, los productos finales se han transformado en los correspondientes clorhidratos con objeto de aumentar su estabilidad y favorecer su solubilidad en agua. Para ello, el producto en forma de base libre se disuelve en diclorometano o éter etílico anhidro (6 mL/mmol) y se añade, gota a gota y bajo atmósfera de argón, una disolución de HCl 2 M en éter etílico (3 mL/mmol), el sólido obtenido se lava con éter etílico anhidro y se seca a vacío. Los datos espectroscópicos de IR y RMN corresponden a la base libre, mientras que el punto de fusión, el análisis elemental y las medidas biológicas corresponden a la sal.

3.1.1. Procedimientos generales

3.1.1.1. *N*-alquilación de biciclohidantoínas

Sobre una disolución de la biciclohidantoína correspondiente (1 equiv) en *N,N*-dimetilformamida (DMF) anhidra (1 mL/mmol), se añade NaH (60%, dispersión en aceite mineral, 1.1 equiv) bajo atmósfera de argón, y la mezcla de reacción se calienta a 60 °C durante 1 h. A continuación, se adiciona, gota a gota, una disolución de 1,4-dibromobutano o cloruro de tritilo (2 equiv) en DMF anhidra (1 mL/mmol) y se calienta a 110 °C durante 3 h. El disolvente se elimina a presión reducida, el sólido resultante se resuspende en agua y se extrae con diclorometano. Los extractos orgánicos se lavan con agua y se secan sobre Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se elimina a presión reducida y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna.

3.1.1.2. Reacción de acoplamiento con paladio

Sobre una disolución del derivado halogenado adecuado (1 equiv) en tolueno anhidro (10 mL/mmol), se añade piperazina (4 equiv), Pd(OAc)₂ (0.1 equiv), (±)-BINAP (0.1 equiv) y NaO^tBu (1.4 equiv) bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agita a 75-95 °C durante 24 h. El disolvente se elimina a presión reducida, se resuspende en diclorometano y se filtra sobre celita. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna.

3.1.1.3. Sustitución nucleófila de derivados halogenados con piperazinas

A una suspensión del derivado halogenado (1 equiv) y de la arilpiperazina correspondiente (1 – 1.7 equiv) en acetonitrilo anhidro (2 mL/mmol), se le añade trietilamina (1.5 equiv) bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se calienta a 60 °C durante 24 h. A continuación, el disolvente se elimina a presión reducida, el residuo se resuspende en agua y se extrae con diclorometano. Los extractos orgánicos se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna.

3.1.1.4. Sustitución nucleófila de derivados halogenados con aminas primarias

A una disolución de la amina (2 a 4 equiv) en acetonitrilo anhidro (1 mL/mmol) se le adiciona, gota a gota, una disolución del derivado halogenado correspondiente (1 equiv) en acetonitrilo anhidro (1 mL/mmol). La mezcla de reacción se calienta a 60 °C durante toda la noche. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, el disolvente se elimina a presión reducida, el residuo se resuspende en diclorometano (25 mL) y se lava con una disolución acuosa de K_2CO_3 al 20%. La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna.

3.1.1.5. Diazotación de anilinas y transformación en bromoderivados

A una disolución de NaOH (0.55 M en H_2O , 1 equiv) se añade la amina correspondiente (1 equiv) y una disolución de HBr (33% en ácido acético, 0.45 mL/mmol de amina). La mezcla de reacción se enfría a -5 °C y se añade gota a gota una disolución de $NaNO_2$ (7 M en H_2O , 1.1 equiv), manteniendo la temperatura por debajo de 2 °C. Una vez completada la adición, la mezcla de reacción se agita durante 30 min a -5 °C y se añade urea (0.13 equiv). La disolución resultante se añade lentamente sobre una disolución recientemente preparada y precalentada a 80 °C de CuBr (1 equiv) en HBr (33% en ácido acético, 0.87 mL/mmol de CuBr). La mezcla se agita a 80 °C durante 30 min, se enfría a temperatura ambiente y se satura con NaCl. El precipitado resultante se filtra, se recrystaliza de H_2O y se seca a alto vacío.

3.1.1.6. Síntesis de sulfonamidas a partir de ácidos sulfónicos

Una disolución del ácido bromonaftalenosulfónico correspondiente (1 equiv) y $SOCl_2$ (40 equiv) en DMF anhidra (3 mL/mmol de ácido sulfónico) se calienta a 85 °C durante 5 h bajo atmósfera de argón. El exceso de $SOCl_2$ se elimina mediante destilación azeotrópica con tolueno a vacío. El residuo resultante se redissuelve en diclorometano (3 mL/mmol de cloruro de sulfonilo) y se enfría a 0 °C bajo atmósfera de argón. Se añade gota a gota una disolución 2.0 M de dimetilamina en THF (20 equiv) y la mezcla de reacción se agita 12 h a temperatura ambiente. Se añade éter etílico y la fase orgánica se lava con una disolución acuosa de HCl al 10% y con una disolución saturada de NaCl. Se seca sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se evapora a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna.

3.1.1.7. Alquilación en el carbono cabeza de puente de biciclohidantoínas

Sobre una disolución de diisopropilamina (2 equiv) en THF anhidro (1.3 mL/mmol), se añade *n*-BuLi (2.5 M en hexano, 2 equiv) gota a gota a 0 °C y bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agita a 0 °C durante 30 min. Transcurrido este tiempo se añade una disolución de la biciclohidantoína correspondiente (1 equiv) en THF anhidro (2.5 mL/mmol), gota a gota y se agita a esta temperatura durante 1 h. A continuación, se adicionan

rápida 4 equiv del correspondiente dibromoalcano, se deja que la mezcla de reacción alcance temperatura ambiente y se agita durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se añade una disolución acuosa saturada de NH_4Cl , la mezcla de reacción se basifica con una disolución acuosa de K_2CO_3 al 20% y se extrae con acetato de etilo. Los extractos orgánicos se secan sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna.

3.1.1.8. Sustitución nucleófila de bromoderivados con azida sódica

Sobre una disolución del derivado halogenado adecuado (1 equiv) en DMF (1.6 mL/mmol), se añade gota a gota, y bajo atmósfera de argón, una disolución de NaN_3 (2.2 equiv) en agua (0.3 mL/mmol) y se calienta a 50 °C durante 24 h o se irradia con microondas a 130 °C durante 10 min. A continuación, se añade agua y se extrae con acetato de etilo, los extractos orgánicos se secan sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida, para obtener las azidas correspondientes que se utilizan en la siguiente etapa sin purificar.

3.1.1.9. Reducción de azidas con trifenilfosfina

Sobre una disolución de la azida adecuada (1 equiv) en una mezcla THF/agua 25:1 (10 mL/mmol), se añade trifenilfosfina (2 equiv) bajo atmósfera de argón y se agita a temperatura ambiente durante 24 h. Se evapora el disolvente a presión reducida, el residuo se redissuelve en acetato de etilo y se extrae con una disolución acuosa de HCl 1 M. La fase acuosa se basifica con una disolución acuosa de K_2CO_3 al 20% y se extrae con acetato de etilo. Los extractos orgánicos se secan sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida, para obtener las aminas correspondientes que se utilizan en la siguiente etapa sin purificar.

3.1.1.10. Desprotección del grupo tritilo

A una disolución de la biciclohidantoína protegida (1 equiv) en diclorometano (10 mL/mmol) se le añade gota a gota TFA (67 equiv). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 h y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna.

3.1.1.11. Protección de aminas con el grupo Boc

A una disolución de la amina adecuada (1 equiv) en una mezcla de THF/agua 1:1 (4 mL/mmol), se le añade, gota a gota, una disolución de anhídrido de Boc (1.1 equiv) en THF (2 mL/mmol) y K_2CO_3 (1.1 equiv) en porciones. La mezcla de reacción se agita toda la noche a temperatura ambiente. El disolvente se elimina a presión reducida, el residuo se resuspende en agua (50 mL/mmol de amina) y se extrae con diclorometano. Los extractos orgánicos se secan

sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna, obteniéndose la amina protegida.

3.1.1.12. Acoplamiento de aminas con cloruros de sulfonilo o de arilo

Sobre una disolución de la amina adecuada (1 equiv) en diclorometano anhidro (10 mL/mmol), se añade trietilamina (3 equiv) y una disolución del cloruro de sulfonilo o de arilo correspondiente (1.5 – 1 equiv) en diclorometano anhidro (3 mL/mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. A continuación, se extrae con una disolución acuosa de NaHCO₃ al 10% y la fase orgánica se lava con una disolución acuosa saturada de NaCl, se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna.

3.1.1.13. Condensación de aminas con ácidos carboxílicos

Método A: Sobre una suspensión de biotina (2 equiv) y HOBt (2 equiv) en DMF anhidra (8.4 mL/mmol), se añaden tamices moleculares de 4 Å previamente activados (35 mg/mmol) y la mezcla se calienta bajo atmósfera de argón hasta la total disolución del ácido carboxílico (77 °C, 50 min). A continuación, se deja que la mezcla alcance la temperatura ambiente, se añade gota a gota una disolución de *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 1.1 equiv) en diclorometano anhidro (3 mL/mmol) y se agita durante 3 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añade una disolución de la amina adecuada (1 equiv) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 0.1 equiv) en diclorometano anhidro (10 mL/mmol de amina), se agita a 60 °C durante 4 h y 24 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtra, se lava con diclorometano/metanol 1:1 y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna.

Método B: Sobre una disolución de ácido 5-hexinoico (1.5 equiv) en diclorometano anhidro (2 mL/mmol) y tamices moleculares de 4 Å previamente activados (35 mg/mmol), se añade una disolución de DCC (1.5 equiv) y DMAP (0.27 equiv) en diclorometano anhidro (10 mL/mmol de DMAP), gota a gota y bajo atmósfera de argón. A continuación, se añade una disolución de la amina adecuada (1 equiv) en diclorometano anhidro (1.3 mL/mmol de amina) y se agita durante 24 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtra y se lava con diclorometano/metanol 1:1. El disolvente se elimina a presión reducida y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna.

Método C: Sobre una disolución del ácido carboxílico correspondiente (1.5 equiv) en DMF anhidra (10 mL/mmol) y diclorometano anhidro (20 mL/mmol), se añaden tamices moleculares de 4 Å previamente activados (35 mg/mmol), HOBt (1.5 equiv) y EDC (1.5 equiv) bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, se añade una disolución de la amina adecuada (1 equiv) en diclorometano

anhidro (20 mL/mmol de amina) y se agita a temperatura ambiente durante 72 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se filtra, se lava con diclorometano/metanol 1:1 y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna.

3.1.1.14. Desprotección del grupo Boc

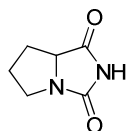
A una disolución de la *N*-Boc amina (1 equiv) en diclorometano (5 mL/mmol) se le añade, gota a gota, TFA (0.2 mL/mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 1-5 h (seguir por c.c.f.). Se neutraliza con una disolución de NaOH 1 M, se extrae con diclorometano y se seca sobre Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se elimina a presión reducida y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna.

3.1.1.15. Desprotección del grupo Fmoc

Sobre una disolución de la *N*-Fmoc amina (1 equiv) en diclorometano anhidro (1 mL/mmol) se añade gota a gota, una disolución de piperidina (5 equiv) en diclorometano anhidro (6 mL/mmol) a 0 °C y bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agita durante 1 h. Transcurrido este tiempo, se añade una disolución acuosa de ácido cítrico al 5% (2 mL/mmol), se lava con agua y se extrae con acetato de etilo. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna.

3.1.2. Síntesis de tetrahidro-1*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-1,3(2*H*)-diona, **23**⁷⁵

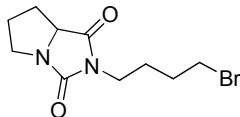
A una disolución de 3.00 g (26 mmol) de L-prolina en 10 mL de agua, se le añaden 3.00 g (37 mmol) de KCNO. La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 3 h, se acidifica con HCl concentrado hasta pH ácido (1-2) y se calienta a reflujo durante 1 h más. El disolvente se elimina a presión reducida, el residuo se seca a vacío y se purifica mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 2:8), obteniéndose 1.97 g (54%) de la hidantoína **23** como un sólido blanco. P.f. 156-158 °C (lit.⁷⁵ p.f. 142-143 °C).



Rf (hexano/acetato de etilo 1:1): 0.1. IR (ATR, cm⁻¹): 3200 (NH), 1770, 1720 (CONCON). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.76 (tt, *J* = 10.5, 8.8, 1H, 1/2CH₂), 2.00-2.26 (m, 3H, CH₂, 1/2CH₂), 3.20 (ddd, *J* = 10.5, 8.4, 4.5, 1H, 1/2CH₂N), 3.68 (dt, *J* = 11.4, 8.4, 1H, 1/2CH₂N), 4.12 (dd, *J* = 8.8, 7.6, 1H, CH), 9.15 (s a, 1H, NH). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): 27.0, 27.2 (2CH₂), 45.1 (CH₂N), 64.6 (CH), 160.7 (NCON), 174.9 (CON).

3.1.3. 2-(4-Bromobutil)tetrahydro-1H-pirrol[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, **24**⁷⁴

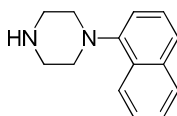
Obtenido a partir de la hidantoína **23** (7.1 mmol) y 1,4-dibromobutano (14 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.1. Cromatografía: hexano/acetato de etilo 8:2. Rto: 79%. Aceite.



R_f (hexano/acetato de etilo 1:1): 0.2. IR (ATR, cm⁻¹): 1775, 1720 (CONCON). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.53-1.90 (m, 5H, 2CH₂, 1/2CH_{2cic}), 2.04-2.13 (m, 2H, CH_{2cic}), 2.21-2.28 (m, 1H, 1/2CH_{2cic}), 3.27 (ddd, *J* = 11.2, 7.3, 5.4, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 3.38-3.54 (m, 4H, CH₂N(CO)₂, CH₂Br), 3.70 (dt, *J* = 11.2, 7.6, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 4.15 (dd, *J* = 8.8, 7.6, 1H, CH). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): 25.4, 25.6, 26.4, 26.9 (2CH₂, 2CH_{2cic}), 32.8 (CH₂Br), 38.0 (CH₂N(CO)₂), 45.5 (CH_{2cic}N), 63.3 (CH), 160.7 (NCON), 173.3 (CON).

3.1.4. 1-(1-Naftil)piperazina, **25**⁶⁷

Obtenido a partir de 1-bromonaftaleno (3.6 mmol) y piperazina (14 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.2. Cromatografía: acetato de etilo/etanol 8:2. Rto: 78%. P.f. 99-101 °C.

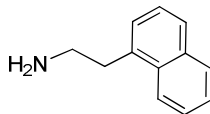


R_f (hexano/acetato de etilo 1:1): 0.04. IR (ATR, cm⁻¹): 1600, 1580, 1510, 1450 (Ar). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 2.86 (s a, 1H, NH), 3.01-3.17 (m, 8H, 4CH_{2pip}), 7.08 (d, *J* = 7.5, 1H, Ar), 7.39 (t ap, *J* = 7.5, 1H, Ar), 7.43-7.47 (m, 2H, Ar), 7.53 (d, *J* = 7.5, 1H, Ar), 7.79-7.82 (m, 1H, Ar), 8.18-8.21 (m, 1H, Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): 46.5 (2CH₂N), 54.6 (2CH₂N), 114.6, 123.3, 123.4, 125.2, 125.7, 125.8, 128.3 (7CH_{Ar}), 128.8, 134.6, 150.0 (3C_{Ar}).

3.1.5. Síntesis de 2-(1-naftil)etanamina, **26**⁶⁶

A una disolución de 6 mL (6.0 mmol) de diborano (1 M en THF) y 12 mL de THF anhidro, se adiciona gota a gota una disolución de 0.30 g (1.8 mmol) de 2-(1-naftil)acetamida en 9 mL de THF anhidro a 0 °C y bajo atmósfera de argón. La reacción se agita a temperatura ambiente durante toda la noche y a reflujo durante 1 h más. Una vez alcanzada la temperatura ambiente se adicionan 0.5 mL de HCl al 10%. El disolvente se elimina a presión reducida y el residuo se basifica (pH 8.5) con una disolución acuosa de NaOH al 10% y se extrae con éter etílico (4 x 25 mL). Los extractos orgánicos se lavan con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secan

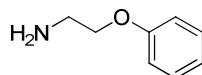
sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se evapora a presión reducida. El aceite resultante se purifica mediante cromatografía en columna (cloroformo/metanol, 9:1), obteniéndose 0.19 g (Rto: 62%) de la amina **26** como un aceite.



Rf (diclorometano/metanol/amoniaco 9:1:0.1): 0.3. IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3365 (NH_2), 1595, 1577, 1510, 1473 (Ar). ^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 1.45 (s a, 2H, NH_2), 3.06-3.28 (m, 4H, $(\text{CH}_2)_2$), 7.23-7.57 (m, 4H, Ar), 7.74 (d, $J = 7.6$, 1H, Ar), 7.84-7.89 (m, 1H, Ar), 8.03-8.08 (m, 1H, Ar). ^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 37.2 (CH_2Ar), 42.8 (CH_2N), 123.7 (CH_{Ar}), 125.4 (2CH_{Ar}), 125.5, 125.9, 126.8, 127.0 (4CH_{Ar}), 132.0, 134.0, 135.8 (3C_{Ar}).

3.1.6. Síntesis de 2-fenoxietanamina, **27**⁶⁵

A una disolución de 0.96 g (6.4 mmol) de 2-fenoxiacetamida en 26 mL de diglime seco, se le adiciona, bajo atmósfera de argón y gota a gota, una disolución de 4.5 mL (51 mmol) del complejo $(\text{CH}_3)_2\text{S}\cdot\text{BH}_3$ (disolución 2 M en THF). La mezcla de reacción se calienta a 90 °C durante 24 h. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se adiciona una disolución acuosa de HCl al 10% hasta pH 2 y la mezcla se calienta a reflujo durante 2 h. El disolvente se elimina a presión reducida, el residuo se resuspende en agua (50 mL) y se extrae con cloroformo (4 x 25 mL). La fase acuosa se basifica con una disolución acuosa de NaOH al 10% (pH 10) y se extrae con cloroformo (4 x 25 mL). Los extractos orgánicos se lavan con una disolución acuosa saturada de NaCl y se secan sobre Na_2SO_4 anhidro. El disolvente se elimina a presión reducida, obteniéndose 0.77 g (Rto: 88%) de la amina **27** como un aceite.

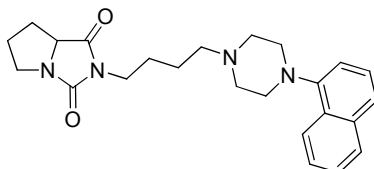


Rf (diclorometano/etanol/amoniaco 9:1:0.1): 0.1. IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3013, 2935 (NH_2), 1601, 1539, 1497, 1458 (Ar). ^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 1.42 (s a, 2H, NH_2), 2.93 (t, $J = 5.2$, 2H, CH_2N), 3.84 (t, $J = 5.2$, 2H, CH_2O), 6.71-6.84 (m, 3H, Ar), 7.09-7.19 (m, 2H, Ar). ^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 41.5 (CH_2N), 69.9 (CH_2O), 114.4 (2CH_{Ar}), 120.7 (CH_{Ar}), 129.3 (2CH_{Ar}), 158.7 (C_{Ar}).

3.1.7. Compuestos no marcados 1, 2

3.1.7.1. 2-{4-[4-(1-Naftil)piperazin-1-il]butil}tetrahidro-1H-pirrol[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 1⁶⁷

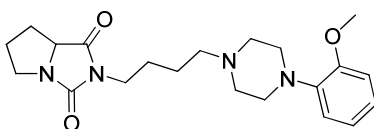
Obtenido a partir del bromoderivado **24** (3.4 mmol) y la piperazina **25** (5.8 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.3. Cromatografía: diclorometano/etanol 95:5. Rto: 95%. Aceite.



R_f (diclorometano/etanol 98:2): 0.3. IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1770, 1705 (CONCON), 1610, 1590, 1520, 1485 (Ar). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.50-1.71 (m, 5H, 2CH₂, 1/2CH_{2cic}), 2.01-2.07 (m, 2H, CH_{2cic}), 2.19-2.24 (m, 1H, 1/2CH_{2cic}), 2.44 (t, *J* = 7.4, 2H, CH_{2Npip}), 2.70 (m, 4H, 2CH_{2pip}), 3.16 (m, 4H, 2CH_{2pip}NAr), 3.26 (ddd, *J* = 11.3, 7.8, 5.0, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 3.52 (t ap, *J* = 7.0, 2H, CH_{2N(CO)₂}), 3.70 (dt, *J* = 11.3, 7.6, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 4.09 (dd, *J* = 9.0, 7.6, 1H, CH_{cic}), 7.50 (d, *J* = 7.2, 1H, Ar), 7.38-7.46 (m, 3H, Ar), 7.53 (d, *J* = 7.8, 1H, Ar), 7.78-7.82 (m, 1H, Ar), 8.11-8.15 (m, 1H, Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): 23.3, 25.8, 27.1, 27.9 ((CH₂)₂, 2CH_{2cic}), 38.5 (CH_{2N(CO)₂}), 45.6 (CH_{2cic}N), 51.0 (2CH_{2pip}NAr), 53.0 (2CH_{2pip}), 57.5 (CH_{2Npip}), 63.1 (CH_{cic}), 114.7 (CH_{Ar}), 123.6 (2CH_{Ar}), 125.4, 125.9, 126.0, 128.5 (4CH_{Ar}), 128.8, 134.8, 149.6 (3C_{Ar}), 161.5 (NCON), 175.1 (CON). Anal. (C₂₆H₃₄N₄O₂·2HCl) C, H, N.

3.1.7.2. 2-{4-[4-(2-Metoxifenil)piperazin-1-il]butil}tetrahidro-1H-pirrol[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 2⁷⁴

Obtenido a partir del bromoderivado **24** (4.5 mmol) y 1-(2-metoxifenil)piperazina (7.5 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.3. Cromatografía: diclorometano/etanol 95:5. Rto: 98%. P.f. 174-178 °C (lit.⁷⁴ 168-170 °C).



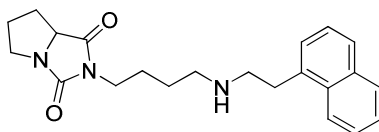
R_f (diclorometano/etanol 95:5): 0.4. IR (KBr, cm⁻¹): 1780, 1720 (CONCON), 1625, 1530, 1500 (Ar). ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 1.55-1.84 (m, 5H, 2CH₂, 1/2CH_{2cic}), 1.96-2.23 (m, 3H, 3/2CH_{2cic}), 3.11-3.33 (m, 7H, CH_{2Npip}, 2CH_{2pip}, 1/2CH_{2cic}N), 3.38 (t, *J* = 6.6, 2H, CH_{2N(CO)₂}), 3.43-3.52 (m, 5H, 2CH_{2pip}NAr, 1/2CH_{2cic}N), 3.81 (s, 3H, CH₃), 4.20 (t ap, *J* = 8.7, 1H, CH_{cic}), 6.91-7.10 (m, 4H, Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 20.4, 24.9 (2CH₂), 26.8 (2CH₂), 37.7

($\underline{\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2}$), 45.3 ($\text{CH}_{2\text{cicN}}$), 47.1 ($2\text{CH}_{2\text{pipNAr}}$), 50.9 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 55.0 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 55.6 (CH_3), 63.0 (CH_{cic}), 112.3, 118.8, 121.0, 124.4 (4CH_{Ar}), 138.5, 152.0 (2C_{Ar}), 160.5 (NCON), 174.1 (CON). Anal. ($\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot 2\text{HCl}$) C, H, N.

3.1.8. Compuestos no marcados 3, 4

3.1.8.1. 2-{4-[(2-(1-Naftil)etil)amino]butil}tetrahidro-1H-pirrolol[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, **3**⁶⁶

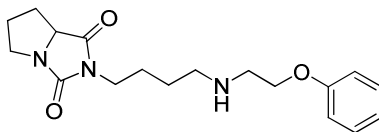
Obtenido a partir del bromoderivado **24** (1.0 mmol) y la amina **26** (2.0 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.4. Cromatografía: acetato de etilo/etanol, 1:1. Rto: 57%. P.f. 97-98 °C.



Rf (acetato de etilo/etanol 1:1): 0.2. IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3400 (NH), 1770, 1708 (NCON). ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.56-1.78 (m, 5H, (CH_2)₂, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.00-2.28 (m, 3H, $3/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.72 (t, $J = 6.8$, 2H, $\underline{\text{CH}_2\text{NH}}$), 3.02 (t, $J = 7.1$, 2H, $\underline{\text{CH}_2\text{NH}}$), 3.11-3.38 (m, 3H, $\underline{\text{CH}_2\text{Ar}}$, $1/2\text{CH}_{2\text{cicN}}$), 3.48 (t, $J = 7.2$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.63-3.74 (m, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cicN}}$), 4.01-4.10 (m, 1H, CH_{cic}), 7.37-7.54 (m, 4H, Ar), 7.71-7.76 (m, 1H, Ar), 7.82-7.86 (m, 1H, Ar), 8.08-8.13 (m, 1H, Ar). ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ): 26.9, 27.0, 27.1, 27.6 ((CH_2)₂, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 33.4 ($\underline{\text{CH}_2\text{Ar}}$), 37.8 ($\underline{\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2}$), 45.5 ($\text{CH}_{2\text{cicN}}$), 49.3, 50.4 ($2\text{CH}_2\text{NH}$), 63.3 (CH_{cic}), 123.7, 125.5, 125.9, 126.2, 126.6, 127.0, 128.8 (7CH_{Ar}), 132.0, 134.0, 136.0 (3C_{Ar}), 160.8 (NCON), 174.0 (CON). Anal. ($\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_2 \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$) C, H, N.

3.1.8.2. 2-{4-[(2-Fenoxietil)amino]butil}tetrahidro-1H-pirrolol[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, **4**⁶⁵

Obtenido a partir del bromoderivado **24** (1.0 mmol) y la amina **27** (2.0 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.4. Cromatografía: diclorometano/etanol, 9:1. Rto: 54%. P.f. 154-155 °C.

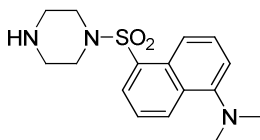


IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3315 (NH), 1770, 1709 (CONCON), 1599, 1587, 1497 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.47-1.77 (m, 5H, 2CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.98-2.29 (m, 3H, $3/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.70 (t, $J = 6.8$, 2H, $\underline{\text{CH}_2\text{NH}}$), 2.99 (t, $J = 4.9$, 2H, $\underline{\text{CH}_2\text{NH}}$), 3.23 (ddd, $J = 11.2$, 7.6, 5.2, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cicN}}$),

3.49 (t, $J = 7.3$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.67 (dt, $J = 11.2$, 7.6, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 4.02-4.10 (m, 3H, CH_{cic} , CH_2O), 6.87-6.98 (m, 3H, Ar), 7.23-7.32 (m, 2H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 26.0, 27.1, 27.3, 27.7 ($(\text{CH}_2)_2$, 2 $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 38.9 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 45.7 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 48.9, 49.4 (2 CH_2NH), 63.4 (CH_{cic}), 67.3 (CH_2O), 114.7 (2 CH_{Ar}), 121.0 (CH_{Ar}), 129.6 (2 CH_{Ar}), 158.3 (C_{Ar}), 160.7 (NCON), 174.0 (CON). Anal. ($\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3\cdot\text{HCl}$) C, H, N.

3.1.9. Síntesis de 5-(dimetilamino)-1-naftilsulfonilpiperazina, **28**⁷⁶

Sobre una disolución de piperazina (36 mol) en diclorometano (20 mL) se añade una disolución de cloruro de dansilo (6.0 mol) en diclorometano (10 mL) durante un periodo de 5 min a temperatura ambiente y se deja reaccionar durante 15 min. Transcurrido este tiempo, se lava con agua y la fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 anhidro. El disolvente se elimina a presión reducida para obtener **28** con un 93% de rendimiento. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos previamente.

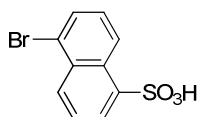


Rf (diclorometano/etanol 95:5): 0.3. ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.71 (s, 1H, NH), 2.84-2.80 (m, 4H, 2 CH_2N), 2.84 (s, 6H, 2 CH_3), 3.13-3.10 (m, 4H, 2 CH_2N), 7.14 (dd, $J = 7.5$, 0.6, 1H, Ar), 7.53-7.47 (m, 2H, Ar), 8.16 (dd, $J = 7.5$, 1.2, 1H, Ar), 8.41 (dt, $J = 8.7$, 0.9, 1H, Ar), 8.53 (dt, $J = 8.4$, 0.9, 1H, Ar).

3.1.10. Ácidos bromonaftalenosulfónicos, **32-34**

3.1.10.1. Ácido 5-bromonaftaleno-1-sulfónico, **32**

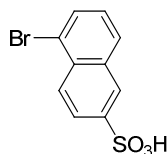
Obtenido a partir de ácido 5-aminonaftaleno-1-sulfónico (22 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.5. Rto: 54%.



IR (KBr, cm^{-1}): 3573, 3453 (OH), 1494 (Ar), 1227, 1199 (SO). ^1H -NMR (300 MHz, metanol- d_4 , δ): 8.25 (dd, $J = 8.6$, 7.5, 1H, Ar), 8.42 (dd, $J = 8.5$, 7.2, 1H, Ar), 8.69 (dd, $J = 7.4$, 1.0, 1H, Ar), 8.87 (dd, $J = 7.2$, 1.2, 1H, Ar), 8.97 (d, $J = 8.5$, 1H, Ar), 9.73 (d, $J = 8.7$, 1H, Ar). ^{13}C -NMR (75 MHz, metanol- d_4 , δ): 123.6 (C_{Ar}), 126.9, 127.7, 128.0, 128.1, 131.1, 131.5 (6 CH_{Ar}), 131.9, 133.7, 142.7 (3 C_{Ar}). MS (ESI): 287.0 [$\text{M}(^{79}\text{Br})+\text{H}$] $^+$, 289.0 [$\text{M}(^{81}\text{Br})+\text{H}$] $^+$.

3.1.10.2. Ácido 5-bromonaftaleno-2-sulfónico, 33

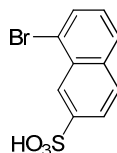
Obtenido a partir de ácido 5-aminonaftaleno-2-sulfónico (11 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.5. Rto: 58%.



IR (KBr, cm^{-1}): 3436 (OH), 1635, 1590, 1559, 1492 (Ar), 1335, 1197 (SO). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ): 3.37 (s a, 1H, OH), 7.44 (dd, $J = 8.1, 7.5$, 1H, Ar), 7.85 (dd, $J = 7.8, 1.7$, 1H, Ar), 7.88 (dd, $J = 5.8, 1.0$, 1H, Ar), 8.05 (d, $J = 7.3$, 1H, Ar), 8.08 (d, $J = 8.5$, 1H, Ar), 8.20 (d, $J = 1.7$, 1H, Ar). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ): 121.1 (C_{Ar}), 125.0, 126.1, 126.2, 127.3, 129.1, 130.7 (6CH_{Ar}), 131.1, 133.9, 146.7 (3C_{Ar}). MS (ESI): 309.0 [$\text{M}(^{79}\text{Br})+\text{Na}^+$], 311.0 [$\text{M}(^{81}\text{Br})+\text{Na}^+$].

3.1.10.3. Ácido 5-bromonaftaleno-3-sulfónico, 34

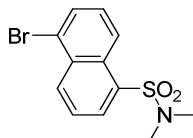
Obtenido a partir de ácido 5-aminonaftaleno-3-sulfónico (13 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.5. Rto: 54%.



IR (KBr, cm^{-1}): 3430 (OH), 1661, 1558 (Ar), 1356, 1185 (SO). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ): 3.40 (s a, 1H, OH), 7.44 (dd, $J = 8.2, 7.5$, 1H, Ar), 7.78 (dd, $J = 8.5, 1.6$, 1H, Ar), 7.89 (dd, $J = 7.5, 1.0$, 1H, Ar), 7.95 (d, $J = 8.5$, 1H, Ar), 7.97 (d, $J = 8.2$, 1H, Ar), 8.40 (s a, 1H, Ar). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ): 122.6 (C_{Ar}), 123.0, 125.2, 127.4, 128.2, 128.6 (5CH_{Ar}), 130.7 ($\text{CH}_{\text{Ar}}, \text{C}_{\text{Ar}}$), 134.3, 147.4 (2C_{Ar}). MS (ESI): 309.0 [$\text{M}(^{79}\text{Br})+\text{Na}^+$], 311.0 [$\text{M}(^{81}\text{Br})+\text{Na}^+$].

3.1.11. *N,N*-Dimetilaminonaftalenosulfonamidas, 35-37**3.1.11.1. 5-Bromo-*N,N*-dimetilnaftaleno-1-sulfonamida, 35**

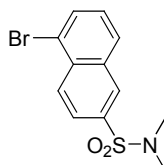
Obtenido a partir del ácido sulfónico **32** (1.0 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.6. Cromatografía: hexano/acetato de etilo 9:1 a 8:2. Rto: 61%.



IR (KBr, cm^{-1}): 1559, 1495, 1456 (Ar), 1337, 1160 (SO). ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ): 2.79 (s, 6H, 2CH_3), 7.45 (dd, $J = 8.7, 7.6$, 1H, Ar), 7.63 (dd, $J = 8.6, 7.5$, 1H, Ar), 7.86 (d, $J = 7.5$, 1H, Ar), 8.22 (d, $J = 7.4$, 1H, Ar), 8.52 (d, $J = 8.6$, 1H, Ar), 8.77 (d, $J = 8.7$, 1H, Ar). ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ): 37.4 (2CH_3), 123.6 (C_{Ar}), 125.2, 125.5, 128.2 (3CH_{Ar}), 130.4 (C_{Ar}), 131.0, 131.2 (2CH_{Ar}), 132.8 (C_{Ar}), 133.4 (CH_{Ar} , C_{Ar}). MS (ESI): 314.0 [$\text{M}(^{79}\text{Br})+\text{H}$] $^+$, 316.0 [$\text{M}(^{81}\text{Br})+\text{H}$] $^+$.

3.1.11.2. 5-Bromo-*N,N*-dimetilnaftaleno-2-sulfonamida, 36

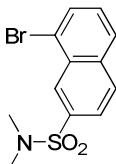
Obtenido a partir del ácido sulfónico **33** (1.7 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.6. Cromatografía: hexano/acetato de etilo 9:1 a 8:2. Rto: 54%.



IR (KBr, cm^{-1}): 1667, 1585, 1558, 1490 (Ar), 1353, 1158 (SO). ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ): 2.78 (s, 6H, 2CH_3), 7.48 (t, $J = 7.9$, 1H, Ar), 7.88 (dd, $J = 8.9, 1.9$, 1H, Ar), 7.96 (dd, $J = 7.6, 1.1$, 1H, Ar), 7.97 (d, $J = 8.2$, 1H, Ar), 8.35 (d, $J = 1.8$, 1H, Ar), 8.41 (d, $J = 8.9$, 1H, Ar). ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ): 38.4 (2CH_3), 123.3 (C_{Ar}), 124.8, 128.4, 129.1 (3CH_{Ar}), 129.6 (2CH_{Ar}), 133.1 (CH_{Ar}), 133.9 (2C_{Ar}), 134.3 (C_{Ar}). MS (ESI): 314.0 [$\text{M}(^{79}\text{Br})+\text{H}$] $^+$, 316.0 [$\text{M}(^{81}\text{Br})+\text{H}$] $^+$.

3.1.11.3. 8-Bromo-*N,N*-dimetilnaftaleno-2-sulfonamida, 37

Obtenido a partir de **34** (1.7 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.6. Cromatografía: hexano/acetato de etilo 9:1 a 8:2. Rto: 53%.

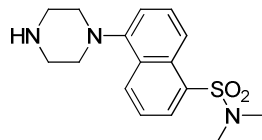


IR (KBr, cm^{-1}): 1585, 1453 (Ar), 1330, 1158 (SO). ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ): 2.70 (s, 6H, 2CH_3), 7.45 (dd, $J = 8.3, 7.5$, 1H, Ar), 7.85 (dd, $J = 8.6, 1.8$, 1H, Ar), 7.91 (m, 2H, Ar), 8.00 (d, $J = 8.6$, 1H, Ar), 8.71 (m, 1H, Ar). ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ): 38.0 (2CH_3), 123.9 (C_{Ar}), 124.1, 127.8, 128.1, 129.0, 129.7 (5CH_{Ar}), 131.3 (C_{Ar}), 131.5 (CH_{Ar}), 134.5, 136.0 (2C_{Ar}). MS (ESI) 314.0 [$\text{M}(^{79}\text{Br})+\text{H}$] $^+$, 316.0 [$\text{M}(^{81}\text{Br})+\text{H}$] $^+$.

3.1.12. Piperazinilsulfonamidas, 29-31

3.1.12.1. *N,N*-Dimetil-5-(piperazin-1-il)naftaleno-1-sulfonamida, 29

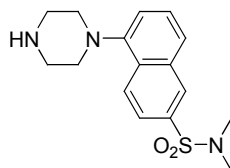
Obtenido a partir del bromoderivado **35** (0.51 mmol) y piperazina (2.0 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.2. Cromatografía: diclorometano/metanol 10:0 a 8:2. Rto: 43%.



IR (KBr, cm^{-1}) 2945 (NH), 2817, 1588, 1572, 1456 (Ar), 1330, 1156 (SO). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ): 2.10 (s a, 1H, NH), 2.82 (s, 6H, 2CH_3), 3.00-3.17 (m, 4H, $2\text{CH}_2\text{N}$), 3.17-3.20 (m, 4H, $2\text{CH}_2\text{N}$), 7.21 (d, $J = 7.5$, 1H, Ar), 7.51-7.59 (m, 2H, Ar), 8.19 (dd, $J = 7.3$, 1.2, 1H, Ar), 8.46 (d, $J = 8.7$, 1H, Ar), 8.55 (d, $J = 8.4$, 1H, Ar). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , δ): 37.4 (2CH_3), 46.0 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 53.8 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 116.3, 121.0, 123.6, 128.1, 129.6 (5CH_{Ar}), 130.2 (C_{Ar}), 130.5 (CH_{Ar} , C_{Ar}), 133.2, 150.3 (2C_{Ar}). MS (ESI) 320.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.1.12.2. *N,N*-Dimetil-5-(piperazin-1-il)naftaleno-2-sulfonamida, 30

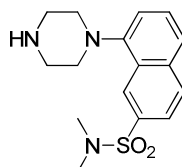
Obtenido a partir del bromoderivado **36** (0.48 mmol) y piperazina (1.9 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.2. Cromatografía: diclorometano/metanol 10:0 a 8:2. Rto: 77%.



IR (KBr, cm^{-1}): 2958 (NH), 1576, 1456 (Ar), 1335, 1157 (SO). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ): 2.70 (s a, 1H, NH), 2.75 (s, 6H, 2CH_3), 3.06-3.15 (m, 4H, $2\text{CH}_2\text{N}$), 3.15-3.24 (m, 4H, $2\text{CH}_2\text{N}$), 7.25 (d, $J = 7.7$, 1H, Ar), 7.54 (dd, $J = 8.1$, 7.6, 1H, Ar), 7.68 (d, $J = 8.2$, 1H, Ar), 7.76 (dd, $J = 8.9$, 1.8, 1H, Ar), 8.31 (d, $J = 1.5$, 1H, Ar), 8.35 (d, $J = 8.9$, 1H, Ar). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , δ): 37.9 (2CH_3), 45.5 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 52.9 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 117.8, 122.6 (2CH_{Ar}), 124.8 (2CH_{Ar}), 127.6, 129.3 (2CH_{Ar}), 130.4, 132.7, 133.5, 149.6 (4C_{Ar}). MS (ESI) 320.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.1.12.3. *N,N*-Dimetil-5-(piperazin-1-il)naftaleno-2-sulfonamida (31)

Obtenido a partir del bromoderivado **37** (0.51 mmol) y piperazina (2.0 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.2. Cromatografía: diclorometano/metanol 10:0 a 8:2. Rto: 72%.

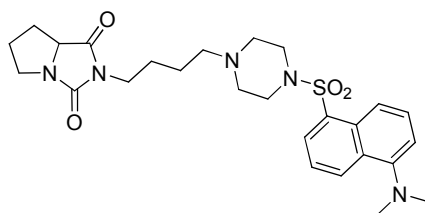


IR (KBr, cm^{-1}): 2956 (NH), 2826, 1617, 1574, 1446 (Ar), 1338, 1157 (SO). ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ): 2.53 (s a, 1H, NH), 2.75 (s, 6H, 2CH_3), 3.11-3.18 (m, 8H, $4\text{CH}_2\text{N}$), 7.19 (dd, $J = 6.8, 1.4$, 1H, Ar), 7.53-7.61 (m, 2H, Ar), 7.75 (dd, $J = 8.6, 1.7$, 1H, Ar), 7.94 (d, $J = 8.6$, 1H, Ar), 8.68 (s a, 1H, Ar). ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ): 37.9 (2CH_3), 45.0 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 52.7 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 116.6, 123.1, 123.5, 124.7 (4CH_{Ar}), 127.7 (C_{Ar}), 128.9, 129.6 (2CH_{Ar}), 132.3, 136.2, 150.5 (3C_{Ar}). MS (ESI): 320.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.1.13. Compuestos marcados con fluoróforos derivados de naftalenosulfonamidas, 5-8

3.1.13.1. 2-[4-(4-{5-(Dimetilamino)-1-naftilsulfonil}piperazin-1-il)butil]tetrahydro-1H-pirrol-1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 5

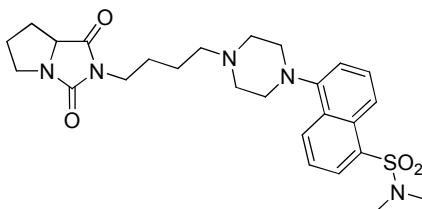
Obtenido a partir del bromoderivado **24** (0.09 mmol) y la piperazina **28** (0.16 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.3. Cromatografía: acetato de etilo. Rto: 99%.



R_f (acetato de etilo): 0.4. IR (ATR, cm^{-1}): 1770, 1709 (CONCON), 1587, 1574, 1444 (Ar), 1330, 1163, 1144 (SO). ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3 , δ): 1.35-1.66 (m, 5H, 2CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.98-2.06 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.20 (m, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.29 (t, $J = 7.1$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 2.43 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 2.86 (s, 6H, 2CH_3), 3.17-3.21 (m, 5H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.40 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.62 (m, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 4.01 (m, 1H, CH_{cic}), 7.16 (d, $J = 7.4$, 1H, Ar), 7.49-7.53 (m, 2H, Ar), 8.16 (dd, $J = 7.3, 1.0$, 1H, Ar), 8.43 (d, $J = 8.7$, 1H, Ar), 8.54 (d, $J = 8.5$, 1H, Ar). ^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3 , δ): 23.7, 25.7, 26.9, 27.4 ($(\text{CH}_2)_2$, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 38.5 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 45.4 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$, 2CH_3), 45.6 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 52.3 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 57.4 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 63.2 (CH_{cic}), 115.1, 119.8, 123.1, 127.9 (4CH_{Ar}), 130.0 (C_{Ar}), 130.5 (2CH_{Ar} , C_{Ar}), 132.4, 151.6 (2C_{Ar}), 160.7 (NCON), 173.8 (CON). MS (ESI): 514.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Anal. ($\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_4\text{S} \cdot 2\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$) C, H, N, S.

3.1.13.2. 5-{4-[4-(1,3-Dioxotetrahidro-1*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-2(3*H*)-il)butil]piperazin-1-il}-*N,N*-dimetilnaftaleno-1-sulfonamida, **6**

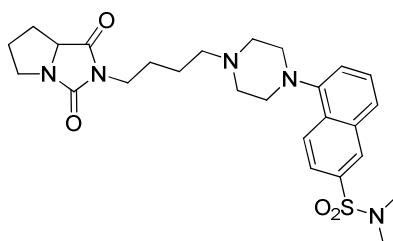
Obtenido a partir del bromoderivado **24** (0.11 mmol) y la piperazina **29** (0.19 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.3. Cromatografía: diclorometano/metanol 10:0 a 95:5. Rto: 82%.



IR (ATR, cm^{-1}): 1771, 1711 (CONCON), 1588, 1572, 1445 (Ar), 1335, 1155 (SO). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.55-1.77 (m, 5H, 2CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.02-2.16 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.26 (m, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.53 (t, $J = 7.6$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 2.75-2.86 (m, 10H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$, $2\text{CH}_3\text{N}$), 3.08-3.17 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$ NAr), 3.25 (m, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$ N), 3.52 (t, $J = 7.0$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.68 (dt, $J = 11.2$, 7.6, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$ N), 4.08 (dd, $J = 8.9$, 7.6, 1H, CH_{cic}), 7.21 (d, $J = 7.5$, 1H, Ar), 7.50-7.58 (m, 2H, Ar), 8.18 (dd, $J = 7.4$, 1.1, 1H, Ar), 8.45 (d, $J = 8.7$, 1H, Ar), 8.52 (d, $J = 8.5$, 1H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 23.8, 26.0, 27.0, 27.5 ($(\text{CH}_2)_2$, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 37.5 (2CH_3), 38.7 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 45.5 ($\text{CH}_{2\text{cic}}$ N), 53.0 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$ NAr), 53.5 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 57.9 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 63.3 (CH_{cic}), 116.1, 120.6, 123.4, 128.1, 129.8 (5CH_{Ar}), 130.1 (C_{Ar}), 130.4 (CH_{Ar} , C_{Ar}), 133.1, 150.2 (2C_{Ar}), 160.8 (NCON), 174.0 (CON). HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 514.2488; encontrado: 514.2487. Anal. ($\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}\cdot\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$) C, H, N, S.

3.1.13.3. 5-{4-[4-(1,3-Dioxotetrahidro-1*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-2(3*H*)-il)butil]piperazin-1-il}-*N,N*-dimetilnaftaleno-2-sulfonamida, **7**

Obtenido a partir del bromoderivado **24** (0.19 mmol) y la piperazina **30** (0.19 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.3. Cromatografía: diclorometano/metanol 10:0 a 95:5. Rto: 53%.

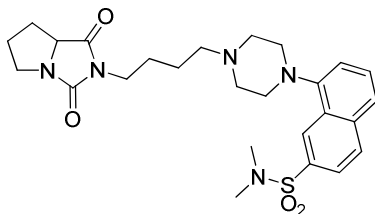


IR (ATR, cm^{-1}): 1770, 1711 (CONCON), 1576, 1444 (Ar), 1338, 1158 (SO). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.52-1.76 (m, 5H, 2CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.02-2.14 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.26 (m, 1H,

1/2CH_{2cic}), 2.52 (t, $J = 7.0$, 2H, CH₂N_{pip}), 2.69-2.80 (m, 10H, 2CH_{2pip}, 2CH₃), 3.12-3.19 (m, 4H, 2CH_{2pip}NAr), 3.25 (ddd, $J = 11.3$, 7.8, 5.0, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 3.52 (t, $J = 6.9$, 2H, CH₂N(CO)₂), 3.68 (dt, $J = 11.2$, 7.6, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 4.08 (dd, $J = 9.0$, 7.6, 1H, CH_{cic}), 7.25 (d, $J = 7.4$, 1H, Ar), 7.53 (t, $J = 7.6$, 1H, Ar), 7.67 (d, $J = 8.1$, 1H, Ar), 7.75 (dd, $J = 8.8$, 2.0, 1H, Ar), 8.31 (d, $J = 1.2$, 1H, Ar), 8.32 (d, $J = 8.6$, 1H, Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): 23.6, 25.9, 26.9, 27.4 ((CH₂)₂, 2CH_{2cic}), 37.9 (2CH₃), 38.6 (CH₂N(CO)₂), 45.4 (CH_{2cic}N), 52.6 (2CH_{2pip}NAr), 53.3 (2CH_{2pip}), 57.8 (CH₂N_{pip}), 63.2 (CH_{cic}), 117.5, 122.4, 124.4, 124.9, 127.6, 129.3 (6CH_{Ar}), 130.4, 132.4, 133.5, 149.6 (4C_{Ar}), 160.7 (NCON), 173.9 (CON). HRMS (ESI) calculado para C₂₆H₃₆N₅O₄S ([M+H]⁺): 514.2488; encontrado: 514.2487. Anal. (C₂₆H₃₅N₅O₄S·2HCl·2H₂O) C, H, N, S.

3.1.13.4. 8-{4-[4-(1,3-Dioxotetrahydro-1H-pirrol-2-yl)imidazol-2(3H)-il]butil}piperazin-1-il)-N,N-dimetilnaftaleno-2-sulfonamida, 8

Obtenido a partir del bromoderivado **24** (0.33 mmol) y la piperazina **31** (0.33 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.3. Cromatografía: diclorometano/metanol 10:0 a 95:5. Rto: 58%.

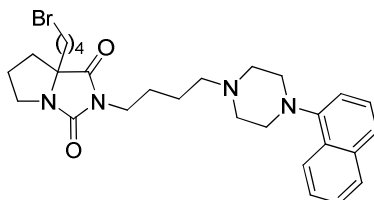


IR (ATR, cm⁻¹) 1770, 1711 (CONCON), 1574, 1444 (Ar), 1342, 1158 (SO). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.56-1.76 (m, 5H, 2CH₂, 1/2CH_{2cic}), 2.03-2.14 (m, 2H, CH_{2cic}), 2.26 (m, 1H, 1/2CH_{2cic}), 2.57 (t, $J = 6.6$, 2H, CH₂N_{pip}), 2.75 (s, 6H, 2CH₃), 2.82 (m, 4H, 2CH_{2pip}), 3.13-3.29 (m, 5H, 2CH_{2pip}NAr, 1/2CH_{2cic}N), 3.52 (t, $J = 6.7$, 2H, CH₂N(CO)₂), 3.68 (dt, $J = 11.2$, 7.7, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 4.09 (dd, $J = 8.9$, 7.6, 1H, CH_{cic}), 7.00 (d, $J = 7.0$, 1H, Ar), 7.53-7.62 (m, 2H, Ar), 7.75 (dd, $J = 8.6$, 1.7, 1H, Ar), 7.94 (d, $J = 8.6$, 1H, Ar), 8.65 (s a, 1H, Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): 23.4, 25.9, 26.9, 27.5 ((CH₂)₂, 2CH_{2cic}), 38.0 (2CH₃), 38.5 (CH₂N(CO)₂), 45.4 (CH_{2cic}N), 52.5 (2CH_{2pip}NAr), 53.1 (2CH_{2pip}), 57.6 (CH₂N_{pip}), 63.3 (CH_{cic}), 116.3, 123.0, 123.1, 124.9 (4CH_{Ar}), 127.7 (C_{Ar}), 128.9, 129.5 (2CH_{Ar}), 131.9, 136.1, 150.5 (3C_{Ar}), 160.7 (NCON), 173.9 (CON). HRMS (ESI) calculado para C₂₆H₃₆N₅O₄S ([M+H]⁺): 514.2488; encontrado: 514.2480. Anal. (C₂₆H₃₅N₅O₄S·2HCl·2H₂O) C, H, N, S.

3.1.14. 7a-(ω -Bromoalquil)biciclohidantoínas 46-49

3.1.14.1. 7a-(4-Bromobutil)-2-{4-[4-(1-naftil)piperazin-1-il]butil}tetrahidro-1H-pirrol[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 46

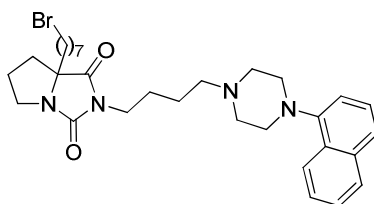
Obtenido a partir de la biciclohidantoína **1** (0.23 mmol) y 1,4-dibromobutano (0.92 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.7. Cromatografía: diclorometano/etanol 98:2. Rto: 74%. Aceite.



Rf (diclorometano/etanol 95:5): 0.4. IR (ATR, cm^{-1}): 1769, 1708 (CONCON), 1581, 1445 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.30-1.61 (m, 7H, 3CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.64-1.81 (m, 5H, 2CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.85-1.99 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.36 (t, $J = 7.3$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 2.59 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 3.00 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 3.05 (ddd, $J = 11.8$, 8.0, 6.6, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.23 (t, $J = 6.7$, 2H, CH_2Br), 3.30-3.45 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.65 (ddd, $J = 11.8$, 8.0, 6.6, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 6.95 (d, $J = 7.3$, 1H, Ar), 7.25 (t ap, $J = 7.8$, 1H, Ar), 7.27-7.36 (m, 2H, Ar), 7.39 (d, $J = 8.1$, 1H, Ar), 7.64-7.68 (m, 1H, Ar), 8.03-8.06 (m, 1H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 22.7, 24.0, 26.0, 26.1, 32.4, 33.0, 33.1 ($(\text{CH}_2)_3$, $(\text{CH}_2)_2$, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 34.2 (CH_2Br), 38.9 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 45.0 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 53.0 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 53.7 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 58.1 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 72.2 (C_{cic}), 114.7, 123.4, 123.6, 125.3, 125.8, 125.9, 128.4 (7CH_{Ar}), 128.9, 134.8, 149.7 (3C_{Ar}), 160.7 (NCON), 176.2 (CON). HPLC (Gradiente-IV, t_R , min): 23.5. MS (ESI): 541.2 [$\text{M}(^{79}\text{Br})+\text{H}$] $^+$, 543.2 [$\text{M}(^{81}\text{Br})+\text{H}$] $^+$.

3.1.14.2. 7a-(7-Bromoheptil)-2-{4-[4-(1-naftil)piperazin-1-il]butil}tetrahidro-1H-pirrol[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 47

Obtenido a partir de la biciclohidantoína **1** (0.18 mmol) y 1,7-dibromoheptano (0.72 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.7. Cromatografía: diclorometano/etanol 95:5. Rto: 88%. Aceite.

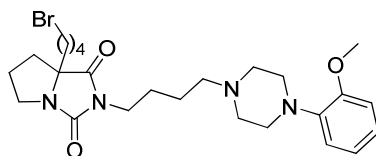


Rf (diclorometano/etanol 95:5): 0.4. IR (ATR, cm^{-1}): 1769, 1708 (CONCON), 1581, 1446 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.12-1.42 (m, 8H, 4CH_2), 1.52-1.72 (m, 5H, 2CH_2 ,

1/2CH_{2cic}), 1.82-1.95 (m, 5H, 2CH₂, 1/2CH_{2cic}), 2.00-2.10 (m, 2H, CH_{2cic}), 2.50 (t ap, $J = 6.8$, 2H, CH_{2N_{pip}}), 2.73 (m, 4H, 2CH_{2pip}), 3.15 (m, 4H, 2CH_{2pip}NAr), 3.19 (ddd, $J = 11.8$, 7.9, 5.9, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 3.38 (t, $J = 6.8$, 2H, CH₂Br), 3.44-3.59 (m, 2H, CH₂N(CO)₂), 3.78 (ddd, $J = 11.8$, 8.1, 6.7, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 7.09 (d, $J = 7.4$, 1H, Ar), 7.40 (t ap, $J = 7.8$, 1H, Ar), 7.43-7.50 (m, 2H, Ar), 7.54 (d, $J = 8.2$, 1H, Ar), 7.79-7.83 (m, 1H, Ar), 8.17-8.20 (m, 1H, Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): 23.9, 24.1, 26.2, 26.3, 28.1, 28.7, 29.4, 32.8, 33.2, 34.0 ((CH₂)₆, (CH₂)₂, 2CH_{2cic}), 35.2 (CH₂Br), 38.9 (CH₂N(CO)₂), 45.0 (CH_{2cic}N), 53.1 (2CH_{2pip}NAr), 53.9 (2CH_{2pip}), 58.2 (CH_{2N_{pip}}), 72.5 (C_{cic}), 114.8, 123.6, 123.7, 125.4, 125.9, 126.0, 128.5 (7CH_{Ar}), 129.0, 134.9, 150.2 (3C_{Ar}), 160.8 (NCON), 176.6 (CON). HPLC (Gradiente-II, t_R, min): 21.0. MS (ESI): 582.5 [M(⁷⁹Br)]⁺, 584.5 [M(⁸¹Br)]⁺.

3.1.14.3. 7a-(4-Bromobutil)-2-{4-[4-(2-metoxifenil)piperazin-1-il]butil}tetrahydro-1H-pirrólo[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 48

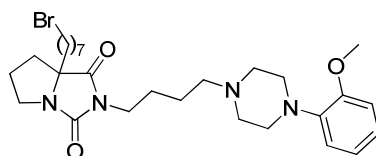
Obtenido a partir de la biciclohidantoína **2** (0.26 mmol) y 1,4-dibromobutano (1.0 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.7. Cromatografía: diclorometano/etanol 98:2. Rto: 89%. Aceite.



R_f (diclorometano/etanol 95:5): 0.5. IR (ATR, cm⁻¹): 1769, 1707 (CONCON), 1499, 1447 (Ar). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.25-1.38 (m, 1H, 1/2CH_{2cic}), 1.49-1.71 (m, 6H, 3CH₂), 1.81-1.93 (m, 5H, 2CH₂, 1/2CH_{2cic}), 1.95-2.08 (m, 2H, CH_{2cic}), 2.43 (t, $J = 7.2$, 2H, CH_{2N_{pip}}), 2.63 (m, 4H, 2CH_{2pip}), 3.09 (m, 4H, 2CH_{2pip}NAr), 3.18 (ddd, $J = 11.8$, 7.9, 6.2, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 3.36 (t, $J = 6.7$, 2H, CH₂Br), 3.47-3.53 (m, 2H, CH₂N(CO)₂), 3.79 (ddd, $J = 11.8$, 8.1, 6.4, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 3.85 (s, 3H, CH₃), 6.83-7.01 (m, 4H, Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): 22.6, 23.8, 25.9, 26.0, 32.2, 33.0, 33.2 ((CH₂)₃, (CH₂)₂, 2CH_{2cic}), 34.0 (CH₂Br), 38.8 (CH₂N(CO)₂), 44.8 (CH_{2cic}N), 50.5 (2CH_{2pip}NAr), 53.3 (2CH_{2pip}), 55.2 (CH₃), 57.9 (CH_{2N_{pip}}), 72.1 (C_{cic}), 111.0, 118.1, 120.8, 122.8 (4CH_{Ar}), 141.2, 152.1 (2C_{Ar}), 160.5 (NCON), 176.0 (CON). HPLC (Gradiente-I, t_R, min): 15.1. MS (ESI): 520.6 [M(⁷⁹Br)]⁺, 522.6 [M(⁸¹Br)]⁺.

3.1.14.4. 7a-(7-Bromoheptil)-2-{4-[4-(2-metoxifenil)piperazin-1-il]butil}tetrahydro-1H-pirrólo[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 49

Obtenido a partir de la biciclohidantoína **2** (0.26 mmol) y 1,7-dibromoheptano (1.0 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.7. Cromatografía: diclorometano/etanol 98:2. Rto: 78%. Aceite.

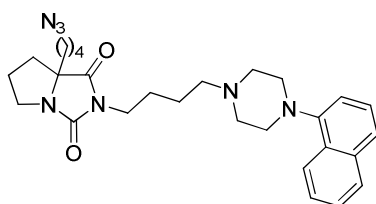


Rf (diclorometano/etanol 95:5): 0.4. IR (ATR, cm^{-1}): 1769, 1708 (CONCON), 1529, 1499, 1446 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.22-1.45 (m, 8H, 4CH_2), 1.48-1.69 (m, 5H, 2CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.77-1.87 (m, 5H, 2CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.98-2.07 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.43 (t, $J = 7.3$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 2.63 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 3.08 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 3.17 (ddd, $J = 11.7$, 7.9, 6.1, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.37 (t, $J = 6.8$, 2H, CH_2Br), 3.45-3.51 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.77 (ddd, $J = 11.7$, 8.1, 6.5, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.85 (s, 3H, CH_3), 6.83-6.99 (m, 4H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 23.9, 24.1, 26.1, 26.2, 28.1, 28.6, 29.3, 32.8, 33.2, 33.9 ($(\text{CH}_2)_6$, $(\text{CH}_2)_2$, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 35.1 (CH_2Br), 38.9 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 45.0 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 50.7 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 53.5 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 55.5 (CH_3), 58.2 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 72.5 (C_{cic}), 111.4, 118.3, 121.1, 123.0 (4CH_{Ar}), 141.5, 152.4 (2C_{Ar}), 160.8 (NCON), 176.5 (CON). HPLC (Gradiente-I, t_{R} , min): 19.1. MS (ESI): 562.6 $[\text{M}(^{79}\text{Br})]^+$, 564.6 $[\text{M}(^{81}\text{Br})]^+$.

3.1.15. 7a-(ω -Azidoalquil)biciclohidantoínas 50-53

3.1.15.1. 7a-(4-Azidobutil)-2-{4-[4-(1-naftil)piperazin-1-il]butil}tetrahidro-1H-pirrolol[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 50

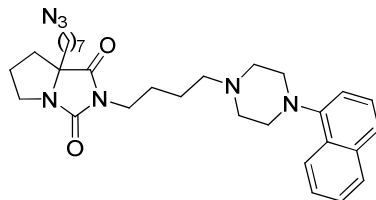
Obtenido a partir del bromoderivado **46** (0.43 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.8, por calefacción a 50 $^{\circ}\text{C}$. Rto: 92%. Aceite.



Rf (diclorometano/etanol 95:5): 0.4. IR (ATR, cm^{-1}): 2096 (N_3), 1769, 1708 (CONCON), 1582, 1447 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.14-1.72 (m, 9H, 4CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.84-2.10 (m, 5H, CH_2 , $3/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.49 (t, $J = 7.3$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 2.70 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 3.14 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 3.20 (ddd, $J = 11.9$, 8.0, 6.3, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.26 (td, $J = 6.7$, 1.7, 2H, CH_2N_3), 3.46-3.56 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.79 (ddd, $J = 11.7$, 8.0, 6.7, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 7.08 (dd, $J = 7.3$, 0.8, 1H, Ar), 7.39 (t ap, $J = 7.8$, 1H, Ar), 7.42-7.49 (m, 2H, Ar), 7.54 (d, $J = 8.2$, 1H, Ar), 7.79-7.83 (m, 1H, Ar), 8.16-8.20 (m, 1H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 21.4, 24.2, 26.1, 26.2, 28.8, 33.2, 34.7 ($(\text{CH}_2)_3$, $(\text{CH}_2)_2$, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 39.0 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 45.1 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 51.3 (CH_2N_3), 53.1 ($\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 53.9 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 58.2 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 72.3 (C_{cic}), 114.8, 123.5, 123.7, 125.4, 125.9, 126.0, 128.5 (7CH_{Ar}), 129.0, 134.9, 149.8 (3C_{Ar}), 160.8 (NCON), 176.3 (CON). HPLC (Gradiente-II, t_{R} , min): 17.3. MS (ESI): 503.7 $[\text{M}]^+$, 504.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.1.15.2. 7a-(7-Azidoheptil)-2-{4-[4-(1-naftil)piperazin-1-il]butil}tetrahidro-1H-pirrolol[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 51

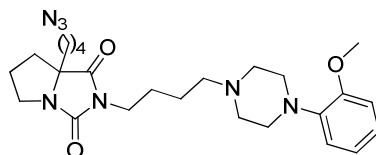
Obtenido a partir del bromoderivado **47** (0.31 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.8, por calefacción a 50 °C. Rto: 87%. Aceite.



Rf (diclorometano/etanol 95:5): 0.4. IR (ATR, cm^{-1}): 2095 (N_3), 1770, 1708 (CONCON), 1577, 1442. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.11-1.35 (m, 9H, 4CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.51-1.72 (m, 6H, 3CH_2), 1.82-1.92 (m, 3H, CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.99-2.12 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.49 (t ap, $J = 7.2$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 2.72 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 3.14-3.24 (m, 7H, CH_2N_3 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$, $2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 3.45-3.56 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.77 (ddd, $J = 11.8$, 8.1, 6.7, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 7.08 (d, $J = 6.9$, 1H, Ar), 7.39 (t, $J = 7.8$, 1H, Ar), 7.42-7.50 (m, 2H, Ar), 7.53 (d, $J = 8.2$, 1H, Ar), 7.78-7.83 (m, 1H, Ar), 8.16-8.20 (m, 1H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 23.9, 24.1, 26.1, 26.2, 26.7, 28.9, 29.0, 29.4, 33.1, 35.1 ($(\text{CH}_2)_6$, $(\text{CH}_2)_2$, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 38.9 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 44.9 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 51.5 (CH_2N_3), 53.1 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 53.8 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 58.2 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 72.5 (C_{cic}), 114.7, 123.5, 123.7, 125.4, 125.9, 126.0, 128.5 (7CH_{Ar}), 129.0, 134.8, 149.8 (3C_{Ar}), 160.8 (NCON), 176.5 (CON). HPLC (Gradiente-II, t_R , min): 20.7. MS (ESI): 545.7 $[\text{M}]^+$, 546.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.1.15.3. 7a-(4-Azidobutil)-2-{4-[4-(2-metoxifenil)piperazin-1-il]butil}tetrahidro-1H-pirrolol[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 52

Obtenido a partir del bromoderivado **48** (0.22 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.8, por calefacción a 50 °C. Rto: 90%. Aceite.

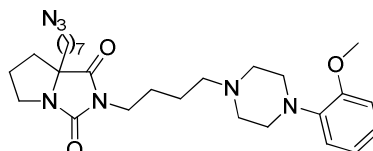


Rf (diclorometano/etanol 95:5): 0.5. IR (ATR, cm^{-1}): 2096 (N_3), 1769, 1708 (CONCON), 1450, 1447 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.19-1.30 (m, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.40-1.70 (m, 8H, 4CH_2), 1.83-1.93 (m, 3H, CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.95-2.08 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.43 (t, $J = 7.3$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 2.63 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 3.09 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 3.18 (ddd, $J = 11.7$, 7.9, 6.2, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.25 (t, $J = 6.7$, 2H, CH_2N_3), 3.46-3.52 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.78 (ddd, $J = 11.7$, 8.2, 6.5, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.85 (s, 3H, CH_3), 6.83-7.00 (m, 4H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ):

21.4, 24.1, 26.1, 26.2, 28.8, 33.2, 34.7 ((CH₂)₃, (CH₂)₂, 2CH_{2cic}), 39.0 (CH₂N(CO)₂), 45.1 (CH_{2cic}N), 50.7 (2CH_{2pip}NAr), 51.3 (CH₂N₃), 53.5 (2CH_{2pip}), 55.5 (CH₃), 58.2 (CH₂N_{pip}), 72.3 (C_{cic}), 111.4, 118.4, 121.1, 123.0 (4CH_{Ar}), 141.5, 152.4 (2C_{Ar}), 160.8 (NCON), 176.3 (CON). HPLC (Gradiente-I, t_R, min): 15.1. MS (ESI): 483.7 [M]⁺, 484.7 [M+H]⁺.

3.1.15.4. 7a-(7-Azidoheptil)-2-{4-[4-(2-metoxifenil)piperazin-1-il]butil}tetrahydro-1H-pirrolol[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 53

Obtenido a partir del bromoderivado **49** (0.19 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.8, por calefacción a 50 °C. Rto: 89%. Aceite.

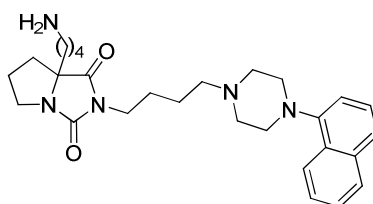


Rf (diclorometano/etanol 95:5): 0.4. IR (ATR, cm⁻¹): 2095 (N₃), 1769, 1709 (CONCON), 1500, 1447 (Ar). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.24-1.38 (m, 8H, 4CH₂), 1.48-1.68 (m, 7H, 3CH₂, 1/2CH_{2cic}), 1.81-1.91 (m, 3H, CH₂, 1/2CH_{2cic}), 1.99-2.11 (m, 2H, CH_{2cic}), 2.42 (t, J = 7.2, 2H, CH₂N_{pip}), 2.63 (m, 4H, 2CH_{2pip}), 3.08 (m, 4H, 2CH_{2pip}NAr), 3.17 (ddd, J = 11.7, 7.9, 5.9, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 3.23 (t, J = 6.8, 2H, CH₂N₃), 3.43-3.53 (m, 2H, CH₂N(CO)₂), 3.76 (ddd, J = 11.7, 8.1, 6.7, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 3.85 (s, 3H, CH₃), 6.83-7.01 (m, 4H, Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): 23.9, 24.1, 26.1, 26.2, 26.7, 28.9, 29.0, 29.4, 33.2, 35.1 ((CH₂)₆, (CH₂)₂, 2CH_{2cic}), 38.9 (CH₂N(CO)₂), 44.9 (CH_{2cic}N), 50.7 (2CH_{2pip}NAr), 51.5 (CH₂N₃), 53.5 (2CH_{2pip}), 55.4 (CH₃), 58.2 (CH₂N_{pip}), 72.5 (C_{cic}), 111.2, 118.3, 121.1, 123.0 (4CH_{Ar}), 141.4, 152.4 (2C_{Ar}), 160.8 (NCON), 176.5 (CON). (Gradiente-I, t_R, min): 18.6. MS (ESI): 525.8 [M]⁺, 526.8 [M+H]⁺.

3.1.16. 7a-(ω-Aminoalquil)biciclohidantoínas 38-41

3.1.16.1. 7a-(4-Aminobutil)-2-{4-[4-(1-naftil)piperazin-1-il]butil}tetrahydro-1H-pirrolol[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 38

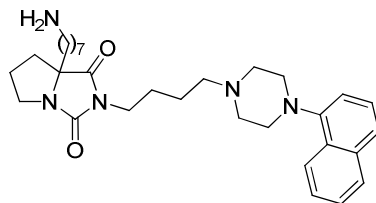
Obtenido a partir de la azida **50** (0.17 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.9, Rto: 92%. Aceite.



^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.35-1.74 (m, 7H, 3CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.79-2.34 (m, 7H, 2CH_2 , $3/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.48 (t, $J = 7.3$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 2.65-2.72 (m, 6H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$, CH_2NH_2), 3.13 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 3.18 (ddd, $J = 11.7$, 7.9, 5.9, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.45-3.56 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.77 (ddd, $J = 11.7$, 8.0, 6.7, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 7.01 (dd, $J = 7.4$, 0.8, 1H, Ar), 7.38 (t ap, $J = 7.8$, 1H, Ar), 7.42-7.49 (m, 2H, Ar), 7.53 (d, $J = 8.2$, 1H, Ar), 7.78-7.82 (m, 1H, Ar), 8.16-8.20 (m, 1H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 21.5, 24.3, 26.3, 26.4, 33.4, 33.6, 35.2 ($(\text{CH}_2)_3$, $(\text{CH}_2)_2$, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 39.2 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 42.1 (CH_2NH_2), 45.2 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 53.3 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 54.0 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 58.4 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 72.7 (C_{cic}), 114.9, 123.7, 123.9, 125.6, 126.1, 126.2, 128.7 (7CH_{Ar}), 129.2, 135.0, 150.0 (3C_{Ar}), 160.8 (NCON), 175.8 (CON).

3.1.16.2. 7a-(7-Aminoheptil)-2-{4-[4-(1-naftil)piperazin-1-il]butil}tetrahydro-1H-pirrol-1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 39

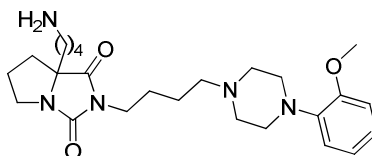
Obtenido a partir de la azida **51** (0.12 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.9. Rto: 84%. Aceite.



IR (ATR, cm^{-1}): 3053 (NH_2), 1708 (CONCON), 1581, 1447, 1409 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.26-1.69 (m, 15H, 7CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.82-1.92 (m, 3H, CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.00-2.09 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.49 (t, $J = 7.2$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 2.64 (t, $J = 6.9$, 2H, CH_2NH_2), 2.72 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 3.13 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 3.19 (ddd, $J = 11.7$, 7.9, 5.9, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.46-3.56 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.77 (ddd, $J = 11.7$, 8.0, 6.7, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 7.08 (d, $J = 6.9$, 1H, Ar), 7.39 (t ap, $J = 7.8$, 1H, Ar), 7.42-7.50 (m, 2H, Ar), 7.53 (d, $J = 8.2$, 1H, Ar), 7.79-7.83 (m, 1H, Ar), 8.17-8.20 (m, 1H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 24.2, 24.3, 26.3, 26.4, 27.1, 29.6, 29.8, 33.4, 34.1, 35.4 ($(\text{CH}_2)_6$, $(\text{CH}_2)_2$, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 39.1 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 42.5 (CH_2NH_2), 45.1 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 53.3 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 54.0 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 58.4 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 72.8 (C_{cic}), 114.9, 123.7, 123.9, 125.6, 126.1, 126.2, 128.7 (7CH_{Ar}), 129.2, 135.0, 150.0 (3C_{Ar}), 160.8 (NCON), 175.8 (CON).

3.1.16.3. 7a-(4-Aminobutil)-2-{4-[4-(2-metoxifenil)piperazin-1-il]butil}tetrahydro-1H-pirrol-1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 40

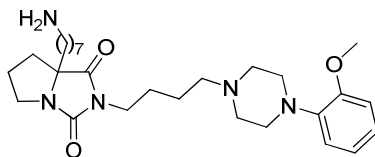
Obtenido a partir de la azida **52** (0.19 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.9. Rto: 86%. Aceite.



Rf (diclorometano/etanol/amoniaco 2:8:0.1): 0.1. IR (ATR, cm^{-1}): 2929 (NH_2), 1769, 1706 (CONCON), 1594, 1501, 1444 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.46-1.70 (m, 7H, 3CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.79-2.15 (m, 7H, 2CH_2 , $3/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.47 (t, $J = 7.4$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 2.67 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 2.73 (t, $J = 6.9$, 2H, CH_2NH_2), 3.09 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 3.19 (ddd, $J = 11.8$, 8.0, 5.8, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.41-3.50 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.77 (ddd, $J = 11.8$, 8.1, 6.7, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.85 (s, 3H, CH_3), 6.83-7.02 (m, 4H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 21.5, 24.2, 26.3, 26.4, 32.6, 33.4, 35.0 ($(\text{CH}_2)_3$, $(\text{CH}_2)_2$, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 39.2 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 41.6 (CH_2NH_2), 45.2 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 50.8 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 53.7 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 55.6 (CH_3), 58.6 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 72.6 (C_{cic}), 111.4, 118.5, 121.3, 123.2 (4CH_{Ar}), 141.6, 152.5 (2C_{Ar}), 161.0 (NCON), 176.7 (CON).

3.1.16.4. 7a-(7-Aminoheptil)-2-{4-[4-(2-metoxifenil)piperazin-1-il]butil}tetrahydro-1H-pirrol[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 41

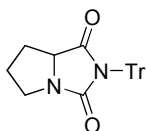
Obtenido a partir de la azida **53** (0.15 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.9. Rto: 87%. Aceite.



IR (ATR, cm^{-1}): 2925 (NH_2), 1769, 1706 (CONCON), 1594, 1500, 1444, 1414 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.26-1.70 (m, 15H, 7CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.81-1.92 (m, 3H, CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.97-2.11 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.42 (t, $J = 7.4$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 2.54-2.70 (m, 6H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$, CH_2NH_2), 3.09 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 3.18 (ddd, $J = 11.7$, 8.0, 5.1, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.40-3.56 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.76 (ddd, $J = 11.7$, 8.2, 6.5, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.85 (s, 3H, CH_3), 6.83-7.03 (m, 4H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 24.1, 24.3, 26.3, 26.4, 27.1, 29.6, 29.7, 33.3, 33.9, 35.3 ($(\text{CH}_2)_6$, $(\text{CH}_2)_2$, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 39.1 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 42.4 (CH_2NH_2), 45.1 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 50.9 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 53.7 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 55.6 (CH_3), 58.4 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 72.7 (C_{cic}), 111.4, 118.5, 121.3, 123.2 (4CH_{Ar}), 141.7, 152.6 (2C_{Ar}), 161.0 (NCON), 176.8 (CON).

3.1.17. 7a-(ω -Bromoalquil)-N-tritilbiciclohidantoínas **54**, **73**

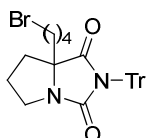
Siguiendo el procedimiento general 3.1.1.1. a partir de la hidantoína **23** (2.9 mmol) y cloruro de tritilo (5.7 mmol), se obtiene 2-tritiltetrahydro-1H-pirrol[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona. Cromatografía: hexano/acetato de etilo 8:2. Rto: 96%. P.f. 254-256 °C.



R_f (hexano/acetato de etilo 1:1): 0.6. IR (ATR, cm⁻¹): 1774, 1714 (CONCON), 1595, 1492, 1450 (Ar). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.30-1.43 (m, 1H, 1/2CH₂), 1.67-1.94 (m, 2H, CH₂), 2.03-2.13 (m, 1H, 1/2CH₂), 3.12 (ddd, *J* = 11.5, 7.9, 5.3, 1H, 1/2CH₂N), 3.58 (dt, *J* = 11.4, 7.3, 1H, 1/2CH₂N), 4.15 (t, *J* = 8.0, 1H, CH), 7.15-7.28 (m, 9H, Ar), 7.42 (d, *J* = 7.4, 6H, Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): 26.4, 27.9 (2CH₂), 46.3 (CH₂N), 62.8 (CH), 73.5 (CPh₃), 126.7 (3CH_{Ar}), 127.6 (6CH_{Ar}), 128.6 (6CH_{Ar}), 142.4 (3C_{Ar}), 160.7 (NCON), 174.2 (CON). HPLC (Gradiente-I, t_R, min): 23.9. MS (ESI): 243.1 [Tr]⁺.

3.1.17.1. 7a-(4-Bromobutil)-2-tritiltetrahidro-1H-pirrololo[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 54

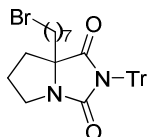
Obtenido a partir de 2-tritiltetrahidro-1H-pirrololo[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona (0.52 mmol) y 1,4-dibromobutano (2.1 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.7. Cromatografía: hexano/diclorometano 3:7. Rto: 81%. P.f. 83-84 °C.



R_f (diclorometano): 0.7. IR (ATR, cm⁻¹): 1776, 1715 (CONCON), 1491, 1450 (Ar). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.47-1.96 (m, 10H, (CH₂)₃, 2CH_{2cic}), 3.08 (ddd, *J* = 12.0, 8.1, 5.7, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 3.47 (t, *J* = 6.5, 2H, CH₂Br), 3.68 (ddd, *J* = 11.9, 7.9, 6.1, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 7.15-7.29 (m, 9H, Ar), 7.41 (d, *J* = 7.2, 6H, Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): 23.1, 25.4, 32.3, 33.5, 33.8 ((CH₂)₃, 2CH_{2cic}), 34.3 (CH₂Br), 45.5 (CH_{2cic}N), 71.6 (C_{cic}), 73.7 (CPh₃), 126.7 (3CH_{Ar}), 127.6 (6CH_{Ar}), 128.5 (6CH_{Ar}), 142.4 (3C_{Ar}), 160.4 (NCON), 176.2 (CON). HPLC (Gradiente-I, t_R, min): 26.1. MS (ESI): 243.1 [Tr]⁺.

3.1.17.2. 7a-(7-Bromoheptil)-2-tritiltetrahidro-1H-pirrololo[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 73

Obtenido a partir de 2-tritiltetrahidro-1H-pirrololo[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona (0.52 mmol) y 1,7-dibromoheptano (2.1 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.7. Cromatografía: hexano/diclorometano 2:8. Rto: 75%. P.f. 62-63 °C.

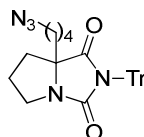


Rf (diclorometano): 0.7. IR (ATR, cm^{-1}): 1776, 1716 (CONCON), 1491, 1450 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.44-1.79 (m, 12H, 5CH_2 , $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.88-1.97 (m, 4H, CH_2 , $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 3.09 (ddd, $J = 11.9, 8.0, 5.7$, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.46 (t, $J = 6.8$, 2H, CH_2Br), 3.69 (ddd, $J = 11.9, 8.1, 6.1$, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 7.18-7.31 (m, 9H, Ar), 7.41-7.45 (m, 6H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 24.2, 25.4, 28.1, 28.7, 29.4, 32.8, 33.8, 33.9 ($(\text{CH}_2)_6$, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 35.3 (CH_2Br), 45.5 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 71.8 (C_{cic}), 73.6 (CPh_3), 126.7 (3CH_{Ar}), 127.6 (6CH_{Ar}), 128.6 (6CH_{Ar}), 142.5 (3C_{Ar}), 160.5 (NCON), 176.5 (CON). HPLC (Gradiente-I, t_R , min): 28.9. MS (ESI): 243.1 $[\text{Tr}]^+$.

3.1.18. 7a-(ω -Azidoalquil)biciclohidantoínas 55, 74

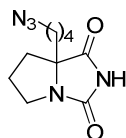
3.1.18.1. 7a-(4-Azidobutil)tetrahidro-1H-pirrolo[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 55

Siguiendo el procedimiento general 3.1.1.8. a partir del bromoderivado **54** (2.5 mmol), por irradiación de microondas a 130 $^{\circ}\text{C}$, se obtiene 7a-(4-azidobutil)-2-trilitetrahidro-1H-pirrolo[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona. Rto: 93%. P.f. 146-147 $^{\circ}\text{C}$.



Rf (diclorometano): 0.6. IR (ATR, cm^{-1}): 2096 (N_3), 1776, 1715 (CONCON), 1595, 1492, 1451 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.44-1.78 (m, 8H, $(\text{CH}_2)_3$, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.82-2.00 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 3.08 (ddd, $J = 11.8, 8.0, 5.8$, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.34 (t, $J = 6.3$, 2H, CH_2N_3), 3.69 (ddd, $J = 11.8, 7.9, 6.0$, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 7.17-7.29 (m, 9H, Ar), 7.41 (d, $J = 7.2$, 6H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 21.7, 25.5, 29.0, 33.8, 34.8 ($(\text{CH}_2)_3$, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 45.6 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 51.4 (CH_2N_3), 71.6 (C_{cic}), 73.7 (CPh_3), 126.7 (3CH_{Ar}), 127.6 (6CH_{Ar}), 128.6 (6CH_{Ar}), 142.4 (3C_{Ar}), 160.5 (NCON), 176.3 (CON). HPLC (Gradiente-I): 26.4. MS (ESI): 243.1 $[\text{Tr}]^+$.

Siguiendo el procedimiento general 3.1.1.10. a partir de 7a-(4-azidobutil)-2-trilitetrahidro-1H-pirrolo[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona (2.3 mmol), se obtiene la azida **55**. Cromatografía: diclorometano/etanol 95:5. Rto: 92%. Aceite.

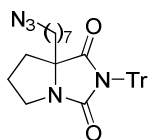


Rf (diclorometano/etanol 95:5): 0.5. IR (ATR, cm^{-1}): 3201 (NH), 2097 (N_3), 1769, 1711 (CONCON). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.23-1.38 (m, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.44-1.67 (m, 4H, 2CH_2), 1.84-1.98 (m, 3H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$, CH_2), 2.00-2.15 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 3.17 (dt, $J = 11.8, 6.9$, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.28 (t, $J = 6.6$, 2H, CH_2N_3), 3.80 (dt, $J = 11.7, 7.4$, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 7.77 (s a, 1H,

NH). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 21.4, 26.2, 28.8, 33.0, 34.6 ($(\text{CH}_2)_3$, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 44.7 ($\text{CH}_{2\text{cicN}}$), 51.3 (CH_2N_3), 73.9 (C_{cic}), 160.1 (NCON), 176.8 (CON). HPLC (Gradiente-I, t_R , min): 18.1. MS (ESI): 210.1 $[\text{M}-\text{N}_2+\text{H}]^+$, 238.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

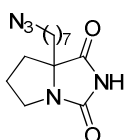
3.1.18.2. 7a-(7-Azidoheptil)tetrahydro-1H-pirrolol[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, **74**

Siguiendo el procedimiento general 3.1.1.8. a partir del bromoderivado **73** (0.50 mmol), por calefacción a 50 °C, se obtiene 7a-(7-azidoheptil)-2-tritiltetrahydro-1H-pirrolol[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona. Rto: 99%. Aceite.



Rf (diclorometano): 0.5. IR (ATR, cm^{-1}): 2095 (N_3), 1776, 1717 (CONCON), 1595, 1492, 1451 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.41-1.50 (m, 8H, 4CH_2), 1.52-1.77 (m, 6H, 3CH_2), 1.84-1.97 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 3.07 (ddd, $J = 11.8, 8.0, 5.8$, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cicN}}$), 3.30 (t, $J = 6.9$, 2H, CH_2N_3), 3.67 (ddd, $J = 11.8, 8.0, 6.1$, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cicN}}$), 7.16-7.28 (m, 9H, Ar), 7.40-7.43 (m, 6H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 24.2, 25.5, 26.7, 28.9, 29.1, 29.5, 33.8, 35.3 (6CH_2 , $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 45.5 ($\text{CH}_{2\text{cicN}}$), 51.5 (CH_2N_3), 71.8 (C_{cic}), 73.6 (CPh_3), 126.7 (3CH_{Ar}), 127.6 (6CH_{Ar}), 128.6 (6CH_{Ar}), 142.5 (3C_{Ar}), 160.5 (NCON), 176.5 (CON). HPLC (Gradiente-I, t_R , min): 28.1. MS (ESI): 243.1 $[\text{Tr}]^+$.

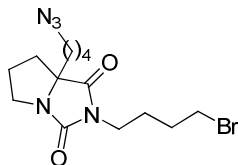
Siguiendo el procedimiento general 3.1.1.10. a partir de 7a-(7-azidoheptil)-2-tritiltetrahydro-1H-pirrolol[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona (0.30 mmol), se obtiene la azida **74**. Cromatografía: hexano/acetato de etilo 1:1. Rto: 89%. Aceite.



Rf (hexano/acetato de etilo 1:1): 0.4. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.17-1.44 (m, 9H, 4CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.51-1.60 (m, 2H, CH_2), 1.81-1.97 (m, 3H, 2CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.99-2.12 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 3.14 (dt, $J = 11.7, 6.9$, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cicN}}$), 3.23 (t, $J = 6.9$, 2H, CH_2N_3), 3.77 (dt, $J = 11.7, 7.4$, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cicN}}$), 8.78 (s a, 1H, NH). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 23.8, 26.1, 26.6, 28.8, 29.0, 29.4, 33.0, 35.0 ($(\text{CH}_2)_6$, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 44.5 ($\text{CH}_{2\text{cicN}}$), 51.5 (CH_2N_3), 74.0 (C_{cic}), 160.4 (NCON), 177.2 (CON).

3.1.19. N-(4-Bromobutil)biciclohidantoínas 56, 70**3.1.19.1. 7a-(4-Azidobutil)-2-(4-bromobutil)tetrahidro-1H-pirrol[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 56**

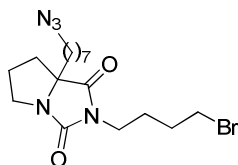
Obtenido a partir de la hidantoína **55** (2.1 mmol) y 1,4-dibromobutano (4.2 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.1. Cromatografía: hexano/acetato de etilo 1:1. Rto: 85%. Aceite.



Rf (hexano/acetato de etilo 1:1): 0.6. IR (ATR, cm^{-1}): 2096 (N_3), 1769, 1707 (CONCON). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.15-1.26 (m, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.37-1.50 (m, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.53-1.67 (m, 3H, CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.72-1.96 (m, 7H, 3CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.00-2.08 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 3.17 (ddd, $J = 11.8, 7.9, 6.1$, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.24 (t, $J = 6.8$, 2H, CH_2N_3), 3.40 (t, $J = 6.5$, 2H, CH_2Br), 3.46-3.56 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.77 (ddd, $J = 11.7, 8.2, 6.6$, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 21.4, 26.1, 26.7, 28.8, 29.9, 32.8, 33.2 ($(\text{CH}_2)_3$, $(\text{CH}_2)_2$, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 34.6 (CH_2Br), 38.0 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 45.0 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 51.3 (CH_2N_3), 72.4 (C_{cic}), 160.6 (NCON), 176.2 (CON). HPLC (Gradiente-I, t_R , min): 23.4. MS (ESI): 372.1 [$\text{M}(^{79}\text{Br})+\text{H}$] $^+$, 374.1 [$\text{M}(^{81}\text{Br})+\text{H}$] $^+$.

3.1.19.2. 7a-(7-Azidoheptil)-2-(4-bromobutil)tetrahidro-1H-pirrol[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 70

Obtenido a partir de la hidantoína **74** (0.42 mmol) y 1,4-dibromobutano (0.84 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.1. Cromatografía: hexano/acetato de etilo 7:3. Rto: 70%. Aceite.



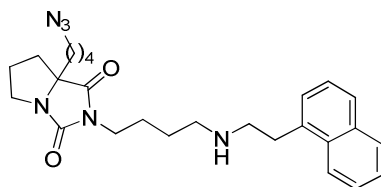
Rf (hexano/acetato de etilo 7:3): 0.6. IR (ATR, cm^{-1}): 2095 (N_3), 1770, 1709 (CONCON). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.22-1.33 (m, 7H, 3CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.49-1.57 (m, 4H, 2CH_2), 1.68-1.91 (m, 7H, 3CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.98-2.07 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 3.16 (ddd, $J = 11.7, 8.0, 6.0$, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.22 (t, $J = 6.9$, 2H, CH_2N_3), 3.39 (t, $J = 6.4$, 2H, CH_2Br), 3.44-3.55 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.74 (ddd, $J = 11.7, 8.2, 6.6$, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 23.9, 26.1, 26.6, 26.7, 28.8, 29.0, 29.3, 29.8, 32.8, 33.2 ($(\text{CH}_2)_6$, $(\text{CH}_2)_2$, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 35.1 (CH_2Br), 37.9

($\underline{\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2}$), 44.9 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 51.5 (CH_2N_3), 72.2 (C_{cic}), 160.6 (NCON), 176.5 (CON). (Gradiente-I, t_R , min): 25.3. MS (ESI): 386.1 [$\text{M}(^{79}\text{Br})\text{-N}_2$] $^{+}$, 388.1 [$\text{M}(^{81}\text{Br})\text{-N}_2$] $^{+}$, 414.1 [$\text{M}(^{79}\text{Br})$] $^{+}$, 416.1 [$\text{M}(^{81}\text{Br})$] $^{+}$.

3.1.20. Aminoazidas 57, 58

3.1.20.1. 7a-(4-Azidobutil)-2-(4-[[2-(1-naftil)etil]amino]butil)tetrahidro-1H-pirrolol[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 57

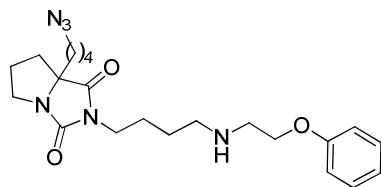
Obtenido a partir del bromoderivado **56** (1.8 mmol) y la amina **26** (3.5 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.4. Cromatografía: acetato de etilo/etanol, 9:1 a 8:2. Rto: 67%. Aceite.



R_f (acetato de etilo/etanol 1:1): 0.4. IR (ATR, cm^{-1}): 2096 (N_3), 1768, 1706 (CONCON), 1446, 1413 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.15-1.26 (m, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.38-1.67 (m, 8H, 4CH_2), 1.80-1.94 (m, 3H, CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.97-2.09 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.65 (t, $J = 7.1$, 2H, CH_2NH), 2.98 (t, $J = 5.8$, 2H, CH_2NH), 3.12-3.28 (m, 5H, CH_2N_3 , CH_2Ar , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.41-3.51 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.76 (ddd, $J = 11.7$, 8.1, 6.6, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 7.33-7.42 (m, 2H, Ar), 7.43-7.53 (m, 2H, Ar), 7.71 (d, $J = 9.0$, 1H, Ar), 7.82-7.85 (m, 1H, Ar), 8.05 (d, $J = 9.0$, 1H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 21.3, 25.9, 26.0, 27.3, 28.8, 33.1, 33.6, 34.6 ($(\text{CH}_2)_3$, $(\text{CH}_2)_2$, CH_2Ar , $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 38.9 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 45.0 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 49.3, 50.5 ($2\text{CH}_2\text{NH}$), 51.2 (CH_2N_3), 72.2 (C_{cic}), 123.8 (CH_{Ar}), 125.6 (2CH_{Ar}), 125.9, 126.0, 127.0, 128.8 (4CH_{Ar}), 132.0, 134.0, 136.2 (3C_{Ar}), 160.7 (NCON), 176.2 (CON). HPLC (Gradiente-I, t_R , min): 21.1. MS (ESI): 463.3 [$\text{M}+\text{H}$] $^{+}$.

3.1.20.2. 7a-(4-Azidobutil)-2-(4-[(2-fenoximetil)amino]butil)tetrahidro-1H-pirrolol[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 58

Obtenido a partir del bromoderivado **56** (1.4 mmol) y la amina **27** (5.6 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.4. Cromatografía: diclorometano/etanol 96:4. Rto: 83%. Aceite.

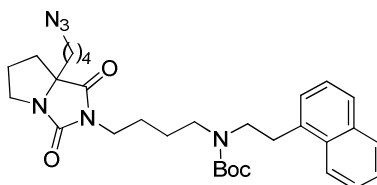


Rf (diclorometano/etanol/amoniaco 95:5:1): 0.7. IR (ATR, cm^{-1}): 2097 (N_3), 1769, 1708 (CONCON), 1595, 1491, 1449 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.13-1.28 (m, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.38-1.71 (m, 8H, 4CH_2), 1.83-1.97 (m, 3H, CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.02-2.10 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.70 (t, $J = 7.1$, 2H, CH_2NH), 2.99 (t, $J = 5.2$, 2H, CH_2NH), 3.18 (ddd, $J = 11.7$, 7.9, 6.1, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.24 (t, $J = 6.7$, 2H, CH_2N_3), 3.44-3.51 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.78 (ddd, $J = 11.7$, 8.1, 6.6, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 4.06 (t, $J = 5.2$, 2H, CH_2O), 6.88-6.97 (m, 3H, Ar), 7.25-7.30 (m, 2H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 21.4, 26.0, 26.1, 27.4, 28.8, 33.2, 34.7 ($(\text{CH}_2)_3$, $(\text{CH}_2)_2$, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 39.0 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 45.1 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 48.9, 49.3 ($2\text{CH}_2\text{NH}$), 51.3 (CH_2N_3), 67.4 (CH_2O), 72.3 (C_{cic}), 114.7 (2CH_{Ar}), 120.9 (CH_{Ar}), 129.6 (2CH_{Ar}), 159.0 (C_{Ar}), 160.8 (NCON), 176.3 (CON). HPLC (Gradiente-I, t_{R} , min): 19.3. MS (ESI): 429.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.1.21. Aminas *N*-Boc protegidas 59, 60

3.1.21.1. 4-[7a-(4-Azidobutil)-1,3-dioxotetrahidro-1*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-2(3*H*)-il]butil[2-(1-naftil)etil]carbamato de *terc*-butilo, 59

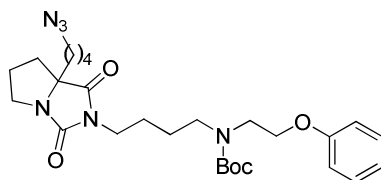
Obtenido a partir de la amina **57** (1.2 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.11. Cromatografía: hexano/acetato de etilo 6:4. Rto: 85%. Aceite.



Rf (hexano/acetato de etilo 6:4): 0.3. IR (ATR, cm^{-1}): 2096 (N_3), 1770, 1706 (CONCON), 1447, 1413 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.13-1.22 (m, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.38-1.63 (m, 17H, 4CH_2 , 3CH_3), 1.81-1.95 (m, 3H, CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.98-2.10 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 3.13-3.26 (m, 7H, CH_2N_3 , CH_2Ar , CH_2NBoc , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.46-3.51 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$, CH_2NBoc), 3.77 (ddd, $J = 11.8$, 8.2, 6.6, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 7.32 (m, 1H, Ar), 7.40 (t, $J = 7.5$, 1H, Ar), 7.47-7.55 (m, 2H, Ar), 7.73 (d, $J = 8.4$, 1H, Ar), 7.85 (d, $J = 8.3$, 1H, Ar), 8.12 (m, 1H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): Mezcla de rotámeros, 21.2, 25.5, 26.0 (3CH_2), 28.5 (3CH_3), 28.7, 31.8, 32.6, 33.1, 34.5 (5CH_2), 38.6 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 45.0 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 46.6, 47.4, 48.3, 48.9 ($2\text{CH}_2\text{NBoc}$ rotámeros), 51.1 (CH_2N_3), 72.2 (C_{cic}), 79.5 (C_{Boc}), 123.7 (CH_{Ar}), 125.6 (2CH_{Ar}), 126.0, 127.0, 127.1, 128.8 (4CH_{Ar}), 132.1, 133.9, 135.4 (3C_{Ar}), 155.4 (NCOO), 160.6 (NCON), 176.2 (CON). HPLC (Gradiente-I, t_{R} , min): 28.6. MS (ESI): 463.3 $[\text{M}-\text{Boc}+\text{H}]^+$.

3.1.21.2. 4-[7a-(4-Azidobutil)-1,3-dioxotetrahidro-1*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-2(3*H*)]butil[2-(2-fenoxietil)]carbamato de *terc*-butilo, 60

Obtenido a partir de la amina **58** (1.2 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.11. Cromatografía: hexano/acetato de etilo 6:4. Rto: 74%. Aceite.

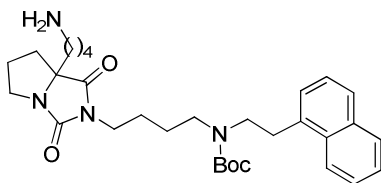


R_f (hexano/acetato de etilo 6:4): 0.3. IR (ATR, cm⁻¹): 2097 (N₃), 1770, 1704 (CON), 1596, 1451 (Ar). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.15-1.25 (m, 1H, 1/2CH_{2cic}), 1.45 (s, 9H, 3CH₃), 1.58-1.65 (m, 8H, 4CH₂), 1.80-1.94 (m, 3H, CH₂, 1/2CH_{2cic}), 1.97-2.07 (m, 2H, CH_{2cic}), 3.15-3.21 (m, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 3.22-3.28 (m, 2H, CH₂N₃), 3.32 (t, *J* = 6.5, 2H, CH₂NBoc), 3.46-3.50 (m, 2H, CH₂N(CO)₂), 3.53-3.56 (m, 2H, CH₂NBoc), 3.78 (ddd, *J* = 11.7, 8.2, 6.6, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 4.04-4.09 (m, 2H, CH₂O), 6.88 (d, *J* = 8.1, 2H, Ar), 6.94 (t, *J* = 6.6, 1H, Ar), 7.28 (t, *J* = 7.8, 2H, Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): Mezcla de rotámeros, 21.3, 25.5 (2CH₂), 26.1 (2CH₂), 28.6 (3CH₃), 28.8, 33.2, 34.7 (3CH₂), 38.8 (CH₂N(CO)₂), 45.1 (CH_{2cic}N), 46.8, 47.1, 47.7, 48.3 (2CH₂NBoc rotámeros), 51.2 (CH₂N₃), 66.4, 66.7 (CH₂O rotámeros), 72.3 (C_{cic}), 79.8 (C_{Boc}), 114.6 (2CH_{Ar}), 121.0 (CH_{Ar}), 129.6 (2CH_{Ar}), 155.4, 155.7 (NCOO, rotámeros), 158.8 (C_{Ar}), 160.7 (NCON), 176.2 (CON). HPLC (Gradiente-I, t_R, min): 26.7. MS (ESI): 429.2 [M-Boc+H]⁺.

3.1.22. 7a-(ω-Aminoalquil)biciclohidantoínas 42, 43

3.1.22.1. 4-[7a-(4-Aminobutil)-1,3-dioxotetrahidro-1*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-2(3*H*)-il]butil-[2-(1-naftil)etil]carbamato de *tert*-butilo, 42

Obtenido a partir de la azida **59** (0.18 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.9. Rto: 56%. Aceite.

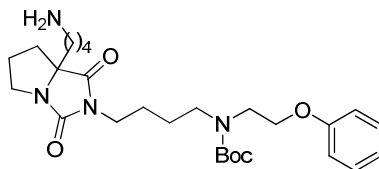


IR (ATR, cm⁻¹): 1770, 1704 (CONCON), 1415 (Ar). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.05-1.14 (m, 1H, 1/2CH_{2cic}), 1.36-1.59 (m, 19H, 4CH₂, 3CH₃, NH₂), 1.73-1.91 (m, 3H, CH₂, 1/2CH_{2cic}), 1.94-2.08 (m, 2H, CH_{2cic}), 2.57 (t, *J* = 6.5, 2H, CH₂NH₂), 3.10-3.24 (m, 5H, CH₂Ar, CH₂NBoc, 1/2CH_{2cic}N), 3.44-3.49 (m, 4H, CH₂N(CO)₂, CH₂NBoc), 3.74 (ddd, *J* = 11.7, 8.1, 6.6, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 7.30 (m, 1H, Ar), 7.38 (t, *J* = 7.5, 1H, Ar), 7.42-7.50 (m, 2H, Ar), 7.71 (d, *J* = 8.3, 1H, Ar), 7.83 (d, *J* = 8.4, 1H, Ar), 8.10 (m, 1H, Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): Mezcla de rotámeros, 21.3, 25.5, 26.0 (3CH₂), 28.5 (3CH₃), 31.9, 32.6, 33.1, 33.4, 34.5 (5CH₂), 38.6 (CH₂N(CO)₂), 41.8 (CH₂NH₂), 44.9 (CH_{2cic}N), 46.6, 47.5, 48.4, 48.9 (2CH₂NBoc rotámeros), 72.4 (C_{cic}), 79.5 (C_{Boc}), 123.8 (CH_{Ar}), 125.6 (2CH_{Ar}), 126.0, 127.0, 127.1, 128.8 (4CH_{Ar}), 132.1,

133.9, 135.4 ($3C_{Ar}$), 155.4 (NCOO), 160.7 (NCON), 176.4 (CON). HPLC (Gradiente-I, t_R , min): 24.1. MS (ESI): 537.3 $[M+H]^+$.

3.1.22.2. 4-[7a-(4-Aminobutil)-1,3-dioxotetrahydro-1H-pirrol[1,2-c]-imidazol-2(3H)-il]-butil-(2-fenoxietil)carbamato de *terc*-butilo, 43

Obtenido a partir de la azida **60** (0.21 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.9. Rto: 66%. Aceite.

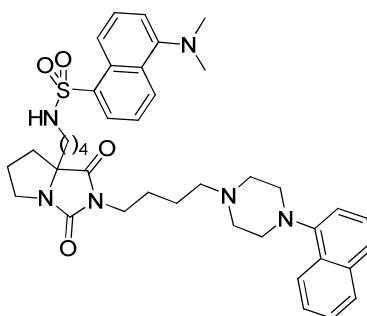


1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$, δ): 1.10-1.17 (m, 1H, $1/2CH_{2cic}$), 1.40-1.47 (m, 11H, $3CH_3$, CH_2), 1.56-1.65 (m, 4H, $2CH_2$), 1.76-1.95 (m, 5H, $2CH_2$, $1/2CH_{2cic}$), 1.98-2.10 (m, 2H, CH_{2cic}), 2.66 (t, $J = 6.1$, 2H, CH_2NH_2), 3.17 (ddd, $J = 11.5$, 7.8, 6.2, 1H, $1/2CH_{2cic}N$), 3.31 (t, $J = 6.2$, 2H, CH_2NBoc), 3.45-3.49 (m, 2H, $CH_2N(CO)_2$), 3.54 (m, 2H, CH_2NBoc), 3.76 (ddd, $J = 11.6$, 8.1, 6.5, 1H, $1/2CH_{2cic}N$), 4.03-4.08 (m, 2H, CH_2O), 6.88 (d, $J = 7.9$, 2H, Ar), 6.93 (t, $J = 7.2$, 1H, Ar), 7.24-7.30 (m, 2H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$, δ): Mezcla de rotámeros, 21.3, 25.5, 26.0, 26.1 ($4CH_2$), 28.5 ($3CH_3$), 33.1, 33.3, 34.9 ($3CH_2$), 38.7 ($CH_2N(CO)_2$), 41.8 (CH_2NH_2), 44.9 ($CH_{2cic}N$), 46.7, 47.0, 47.6, 48.3 ($2CH_2NBoc$ rotámeros), 66.3, 66.7 (CH_2O rotámeros), 72.4 (C_{cic}), 79.8 (C_{Boc}), 114.5 ($2CH_{Ar}$), 120.9 (CH_{Ar}), 129.6 ($2CH_{Ar}$), 155.3, 155.6 (NCOO rotámeros), 158.7 (C_{Ar}), 160.7 (NCON), 176.4 (CON). HPLC (Gradiente-I, t_R , min): 21.3. MS (ESI): 503.3 $[M+H]^+$.

3.1.23. Compuestos marcados con dansilo, lisamina o NBD 9-16

3.1.23.1. 5-(Dimetilamino)-N-{4-[2-[4-[4-(1-naftil)piperazin-1-il]butil]-1,3-dioxotetrahydro-1H-pirrol[1,2-c]imidazol-7a(5H)-il]butil}naftaleno-1-sulfonamida, 9

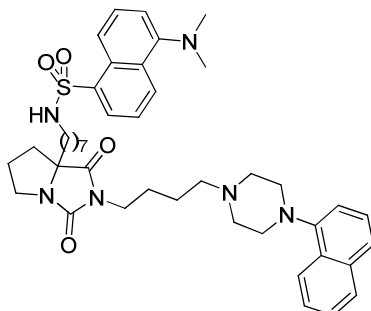
Obtenido a partir de la amina **38** (0.11 mmol) y cloruro de dansilo (0.16 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.12. Cromatografía: diclorometano/etanol 95:5. Rto: 55%. P.f. descompone.



R_f (diclorometano/etanol 9:1): 0.2. IR (ATR, cm⁻¹): 3285 (NH), 1767, 1703 (CONCON), 1580, 1449 (Ar). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.20-1.80 (m, 12H, 5CH₂, CH_{2cic}), 1.94-2.04 (m, 2H, CH_{2cic}), 2.49 (t, *J* = 7.1, 2H, CH_{2N_{pip}}), 2.73 (m, 4H, 2CH_{2pip}), 2.81-2.97 (m, 8H, 2CH₃, CH_{2NH}), 3.03-3.13 (m, 5H, 2CH_{2pip}NAr, 1/2CH_{2cic}N), 3.43-3.53 (m, 2H, CH_{2N(CO)₂}), 3.67-3.77 (m, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 5.27 (s a, 1H, NH), 7.01 (d, *J* = 6.7, 1H, naft), 7.17 (d, *J* = 7.5, 1H, Ds), 7.38 (t ap, *J* = 7.8, 1H, naft), 7.32-7.59 (m, 5H, naft, Ds), 7.78-7.84 (m, 1H, naft), 8.13-8.20 (m, 1H, naft), 8.22 (dd, *J* = 7.3, 1.2, 1H, Ds), 8.28 (d, *J* = 8.7, 1H, Ds), 8.52 (d, *J* = 8.5, 1H, Ds). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): 21.4, 24.3, 26.2, 26.3, 29.7, 33.2, 34.6 ((CH₂)₃, (CH₂)₂, 2CH_{2cic}), 39.1 (CH_{2N(CO)₂}), 43.2 (CH_{2NH}), 45.1 (CH_{2cic}N), 45.7 (2CH₃), 53.0 (2CH_{2pip}NAr), 54.0 (2CH_{2pip}), 58.4 (CH_{2N_{pip}}), 72.5 (C_{cic}), 115.0 (CH_{naft}), 115.5, 119.0, 123.5 (3CH_{Ds}), 123.8, 123.9, 125.6, 126.1, 126.2 (5CH_{naft}), 128.7 (CH_{naft}, CH_{Ds}), 129.1 (C_{naft}), 129.8 (CH_{Ds}), 129.9, 130.2 (2C_{Ds}), 130.7 (CH_{Ds}), 135.0 (C_{naft}), 135.3 (C_{Ds}), 149.8 (C_{naft}), 152.2 (C_{Ds}), 160.8 (NCON), 176.5 (CON). HRMS (ESI) calculado para C₄₀H₅₁N₆O₄S ([M+H]⁺): 711.3687; encontrado: 711.3666. Anal. (C₄₀H₅₀N₆O₄S·3HCl·2H₂O) C, H, N, S.

3.1.23.2. 5-(Dimetilamino)-*N*-{7-[2-{4-[4-(1-naftil)piperazin-1-il]butil}-1,3-dioxotetrahidro-1*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-7a(5*H*)-il]heptil}naftaleno-1-sulfonamida, 10

Obtenido a partir de la amina **39** (0.14 mmol) y cloruro de dansilo (0.21 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.12. Cromatografía: diclorometano/etanol 95:5. Rto: 70%. P.f. descompone.

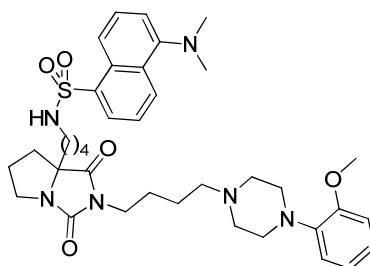


R_f (diclorometano/etanol 95:5): 0.2. IR (ATR, cm⁻¹): 3291 (NH), 1766, 1703 (CONCON), 1580, 1449 (Ar). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.10-1.32 (m, 8H, 4CH₂), 1.47-1.68 (m, 6H, 3CH₂), 1.78-1.87 (m, 4H, CH₂, CH_{2cic}), 1.95-2.14 (m, 2H, CH_{2cic}), 2.48 (t, *J* = 7.3, 2H, CH_{2N_{pip}}), 2.71 (m, 4H, 2CH_{2pip}), 2.84 (q, *J* = 6.6, 2H, CH_{2NH}), 2.88 (s, 6H, 2CH₃), 3.13 (m, 4H, 2CH_{2pip}NAr), 3.17 (ddd, *J* = 11.6, 7.8, 5.9, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 3.43-3.56 (m, 2H, CH_{2N(CO)₂}), 3.77 (ddd, *J* = 11.6, 8.0, 6.6, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 4.65 (t a, *J* = 6.1, 1H, NH), 7.07 (d, *J* = 7.3, 1H, naft), 7.18 (d, *J* = 7.3, 1H, Ds), 7.39 (t ap, *J* = 7.8, 1H, naft), 7.41-7.58 (m, 5H, naft, Ds), 7.77-7.85 (m, 1H, naft), 8.14-8.20 (m, 1H, naft), 8.23 (dd, *J* = 7.3, 1.2, 1H, Ds), 8.28 (d, *J* = 8.7, 1H, Ds), 8.53 (d, *J* = 8.5, 1H, Ds). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): 24.0, 24.3, 26.3, 26.4, 26.6, 29.0, 29.5, 29.8

33.4, 35.2 ((CH₂)₆, (CH₂)₂, 2CH_{2cic}), 39.1 (CH₂N(CO)₂), 43.5 (CH₂NH), 45.1 (CH_{2cic}N), 45.7 (2CH₃), 53.3 (2CH_{2pip}NAr), 54.0 (2CH_{2pip}), 58.4 (CH_{2Npip}), 72.7 (C_{cic}), 114.9 (CH_{naft}), 115.5, 119.0, 123.5 (3CH_{DS}), 123.7, 123.9, 125.6, 126.1, 126.2 (5CH_{naft}), 128.6, 128.7 (CH_{naft}, CH_{DS}), 129.2 (C_{naft}), 130.0 (CH_{DS}, C_{DS}), 130.2 (C_{DS}), 130.7 (CH_{DS}), 135.0 (C_{naft}), 135.1 (C_{DS}), 150.0 (C_{naft}), 152.3 (C_{DS}), 161.0 (NCON), 176.8 (CON). HRMS (ESI) calculado para C₄₃H₅₇N₆O₄S ([M+H]⁺): 753.4156; encontrado: 753.4130. Anal. (C₄₃H₅₆N₆O₄S·3HCl·H₂O) C, H, N, S.

3.1.23.3. 5-(Dimetilamino)-N-{4-[2-{4-[4-(2-metoxifenil)piperazin-1-il]butil}-1,3-dioxotetrahydro-1H-pirrolol[1,2-c]imidazol-7a(5H)-il]butil}naftaleno-1-sulfonamida, 11

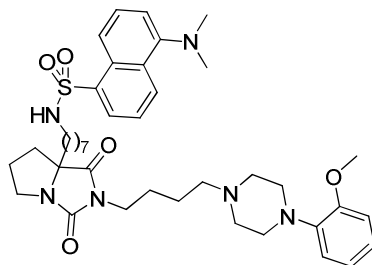
Obtenido a partir de la amina **40** (0.30 mmol) y cloruro de dansilo (0.45 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.12. Cromatografía: diclorometano/etanol 98:2. Rto: 80%. P.f. descompone.



Rf (diclorometano/etanol 95:5): 0.1. IR (ATR, cm⁻¹): 3271 (NH), 1768, 1705 (CONCON), 1583, 1498, 1450 (Ar). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.20-2.02 (m, 14H, 5CH₂, 2CH_{2cic}), 2.40 (t, J = 7.4, 2H, CH_{2Npip}), 2.62 (m, 4H, 2CH_{2pip}), 2.80-3.00 (m, 8H, N(CH₃)₂, CH₂NH), 3.03-3.15 (m, 5H, 2CH_{2pip}NAr, 1/2CH_{2cic}N), 3.36-3.53 (m, 2H, CH₂N(CO)₂), 3.64-3.76 (m, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 3.84 (s, 3H, CH₃O), 5.20 (t a, J = 5.9, 1H, NH), 6.81-7.01 (m, 4H, Ph), 7.18 (d, J = 7.5, 1H, Ds), 7.50 (dd, J = 8.4, 7.4, 1H, Ds), 7.54 (dd, J = 8.4, 7.8, 1H, Ds), 8.21 (dd, J = 7.3, 1.1, 1H, Ds), 8.27 (d, J = 8.7, 1H, Ds), 8.53 (d, J = 8.5, 1H, Ds). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): 21.4, 24.3, 26.2, 26.3, 29.7, 33.2, 34.6 ((CH₂)₃, (CH₂)₂, 2CH_{2cic}), 39.1 (CH₂N(CO)₂), 43.2 (CH₂NH), 45.1 (CH_{2cic}N), 45.7 (2CH₃N), 50.8 (2CH_{2pip}NAr), 53.7 (2CH_{2pip}), 55.7 (CH₃O), 58.4 (CH_{2Npip}), 72.5 (C_{cic}), 111.5 (CH_{Ph}), 115.6 (CH_{DS}), 118.6 (CH_{Ph}), 119.0 (CH_{DS}), 121.3, 123.2 (2CH_{Ph}), 123.5, 128.7, 129.8 (3CH_{DS}), 129.9, 130.2 (2C_{DS}), 130.7 (CH_{DS}), 135.4 (C_{DS}), 141.7 (C_{Ph}), 152.3, 152.6 (C_{Ph}, C_{DS}), 160.8 (NCON), 176.5 (CON). HPLC (Gradiente-IV, t_R, min): 27.3. HRMS (ESI) calculado para C₃₇H₅₁N₆O₅S ([M+H]⁺): 691.3636; encontrado: 691.3623. Anal. (C₃₇H₅₀N₆O₅S·3HCl·3H₂O) C, H, N, S.

3.1.23.4. 5-(Dimetilamino)-*N*-{7-[2-{4-[4-(2-metoxifenil)piperazin-1-il]butil}-1,3-dioxotetrahidro-1*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-7a(5*H*)-il]heptil}naftaleno-1-sulfonamida, 12

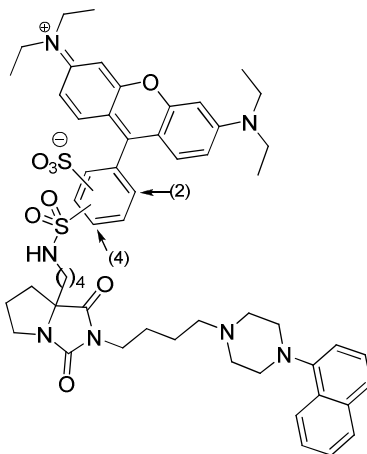
Obtenido a partir de la amina **41** (0.08 mmol) y cloruro de dansilo (0.12 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.12. Cromatografía: diclorometano/etanol 98:2. Rto: 82%. P.f. descompone.



Rf (diclorometano/etanol 95:5): 0.1. IR (ATR, cm^{-1}): 3284 (NH), 1767, 1705 (CONCON), 1583, 1499, 1449 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.26-1.35 (m, 8H, 4CH_2), 1.48-1.70 (m, 6H, 3CH_2), 1.75-1.91 (m, 4H, CH_2 , $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.98-2.12 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.40 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 2.66 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 2.80-2.95 (m, 8H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, CH_2NH), 3.00-3.25 (m, 5H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.40-3.59 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.71-3.83 (m, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.86 (s, 3H, CH_3O), 4.71 (s a, 1H, NH), 6.83-7.05 (m, 4H, Ph), 7.19 (d, $J = 7.6$, 1H, Ds), 7.53 (dd, $J = 8.3$, 7.5, 1H, Ds), 7.57 (t ap, $J = 8.1$, 1H, Ds), 8.24 (dd, $J = 7.3$, 0.9, 1H, Ds), 8.29 (d, $J = 8.6$, 1H, Ds), 8.55 (d, $J = 8.5$, 1H, Ds). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 24.1, 24.2, 26.3, 26.4, 26.6, 29.0, 29.4, 29.8, 33.4, 35.2 ($(\text{CH}_2)_6$, $(\text{CH}_2)_2$, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 39.1 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 43.5 (CH_2NH), 45.1 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 45.8 ($2\text{CH}_3\text{N}$), 50.9 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 53.7 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 55.7 (CH_3O), 58.4 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 72.7 (C_{cic}), 111.5 (CH_{Ph}), 115.5 (CH_{Ds}), 118.5 (CH_{Ph}), 119.0 (CH_{Ds}), 121.3, 123.3 (2CH_{Ph}), 123.5, 128.7 (2CH_{Ds}), 130.0 (CH_{Ds} , C_{Ds}), 130.2 (C_{Ds}), 130.7 (CH_{Ds}), 135.1 (C_{Ds}), 141.6 (C_{Ph}), 152.3, 152.6 (C_{Ph} , C_{Ds}), 161.0 (NCON), 176.7 (CON). HPLC (Gradiente-IV, t_R , min): 35.5. HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{57}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 733.4107; encontrado: 733.4080. Anal. ($\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{N}_6\text{O}_5\text{S} \cdot 3\text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) C, H, N, S.

3.1.23.5. *N*-{4-[2-{4-[4-(1-Naftil)piperazin-1-il]butil}-1,3-dioxotetrahidro-1*H*-pirrolo[1,2-*c*]-imidazol-7a(5*H*)-il]butil}lisaminamida, 13

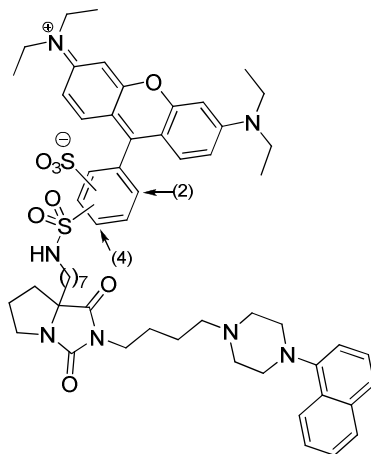
Obtenido a partir de la amina **38** (0.17 mmol) y cloruro de lisamina (0.17 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.12. Cromatografía: diclorometano/etanol 95:5 a 9:1. Rto: 35%. P.f. 200-205 °C.



Rf (diclorometano/etanol 9:1): 0.3. IR (ATR, cm^{-1}): 1766, 1705 (CO), 1589, 1452 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, metanol- d_4 , δ): 1.26-1.32 (m, 12H, 4CH₃), 1.52-1.91 (m, 11H, 5CH₂, 1/2CH_{2cic}), 1.98-2.21 (m, 3H, 3/2CH_{2cic}), 2.57 (m, 2H, CH_{2N_{pip}}), 2.80 (m, 4H, 2CH_{2pip}), 3.00-3.07 (m, 6H, CH₂NH, 2CH_{2pip}NAr), 3.25 (ddd, $J = 11.5, 8.3, 5.6$, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 3.46-3.54 (m, 2H, CH₂N(CO)₂), 3.60-3.73 (m, 9H, 4CH₂CH₃, 1/2CH_{2cic}N), 6.88-7.10 (m, 6H, naft, lis), 7.26-7.49 (m, 6H, naft, lis), 7.71-7.76 (m, 1H, naft), 8.02-8.12 (m, 2H, naft, lis), 8.62-8.64 (m, 1H, lis). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): 12.6 (4CH₃), 21.0, 23.7, 26.0, 26.1, 29.6 32.9, 34.4 ((CH₂)₃, (CH₂)₂, 2CH_{2cic}), 38.7 (CH₂N(CO)₂), 43.1 (CH₂NH), 44.9 (CH_{2cic}N), 46.1 (4CH₂CH₃), 52.6 (2CH_{2pip}NAr), 53.6 (2CH_{2pip}), 57.9 (CH_{2N_{pip}}), 72.4 (C_{cic}), 95.6, 96.0, 114.4 (3CH_{lis}), 114.8 (CH_{naft}), 116.2 (CH_{lis}), 123.5, 123.6, 125.4 (3CH_{naft}), 125.8 (2CH_{lis}), 125.9 (2CH_{naft}), 127.1, 127.4 (2CH_{lis}), 128.3 (CH_{naft}), 128.8 (C_{naft}), 129.7 (CH_{lis}), 134.7 (C_{naft}), 141.9, 142.1, 147.8 (3C_{lis}), 149.5 (C_{naft}), 155.5, 156.5, 156.8, 157.8, 158.0, 158.4, 158.9 (8C_{lis}), 160.6 (NCON), 176.5 (CON). HRMS (ESI) calculado para C₅₅H₆₈N₇O₈S₂ ([M+H]⁺): 1018.4565, encontrado: 1018.4514. Anal. (C₅₅H₆₇N₇O₈S₂·3HCl·H₂O) C, H, N, S.

3.1.23.6. *N*-{7-[2-{4-[4-(1-Naftil)piperazin-1-il]butil}-1,3-dioxotetrahidro-1*H*-pirrolo[1,2-*c*]-imidazol-7a(5*H*)-il]heptil}lisaminamida, 14

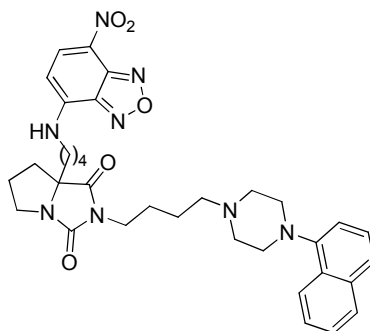
Obtenido a partir de la amina **39** (0.10 mmol) y cloruro de lisamina (0.10 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.12. Cromatografía: diclorometano/etanol 95:5 a 9:1. Rto: 25%. P.f. 160-165 °C.



R_f (diclorometano/etanol 95:5): 0.2. IR (ATR, cm⁻¹): 1767, 1707 (CONCON), 1589, 1451 (Ar). ¹H-RMN (700 MHz, metanol-*d*₄, δ): 1.16-1.18 (m, 1H, 1/2CH_{2cic}), 1.29-1.34 (m, 18H, 4CH₃, 3CH₂), 1.51-1.73 (m, 8H, 4CH₂), 1.86-1.93 (m, 3H, CH₂, 1/2CH_{2cic}), 2.05-2.25 (m, 2H, CH_{2cic}), 2.67 (m, 2H, CH_{2Npip}), 2.89 (m, 4H, 2CH_{2pip}), 3.01 (t, *J* = 6.9, 2H, CH₂NH), 3.13 (m, 5H, 2CH_{2pip}NAr, 1/2CH_{2cic}N), 3.23 (m, 2H, CH₂N(CO)₂), 3.37-3.42 (m, 2H, 1/2CH_{2cic}N), 3.48-3.81 (m, 8H, 4CH₂CH₃), 6.92-7.17 (m, 6H, naft, lis), 7.34-7.58 (m, 6H, naft, lis), 7.78-7.85 (m, 1H, naft), 8.06-8.20 (m, 2H, naft, lis), 8.65 (d, *J* = 2.6, 1H, lis). ¹³C-RMN (175 MHz, metanol-*d*₄, δ): 13.8 (4CH₃), 24.3, 25.1, 26.9, 27.0, 27.4, 30.0, 30.3, 30.7, 33.9, 35.8 ((CH₂)₆, (CH₂)₂, 2CH_{2cic}), 39.4 (CH₂N(CO)₂), 44.1 (CH₂NH), 45.9 (CH_{2cic}N), 46.8, 47.8 (4CH₂CH₃), 53.3 (2CH_{2pip}NAr), 54.6 (2CH_{2pip}), 58.9 (CH_{2Npip}), 74.0 (C_{cic}), 97.0, 97.3 (2CH_{lis}), 115.0 (CH_{naft}), 115.2 (2C_{lis}), 115.8, 117.0 (2CH_{lis}), 124.4, 124.9 (CH_{naft}, CH_{lis}), 126.3 (C_{lis}), 126.4, 126.5 (2CH_{naft}), 126.9 (2CH_{lis}), 127.6, 129.2, 129.4 (3CH_{naft}), 130.0 (C_{naft}), 132.4, 133.6 (2CH_{lis}), 135.2 (C_{naft}), 136.2, 144.5, 147.3 (3C_{lis}), 150.4 (C_{naft}), 154.2, 156.5, 157.1, 159.3 (4C_{lis}), 162.4 (NCON), 178.4 (CON). HRMS (ESI) calculado para C₅₈H₇₄N₇O₈S₂ ([M+H]⁺): 1060.5035, encontrado: 1060.5054. Anal. (C₅₈H₇₃N₇O₈S₂·3HCl·H₂O) C, H, N, S.

3.1.23.7. 2-{4-[4-(1-Naftil)piperazin-1-il]butil}-7a-{4-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]butil}tetrahidro-1*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-1,3(2*H*)-diona, 15

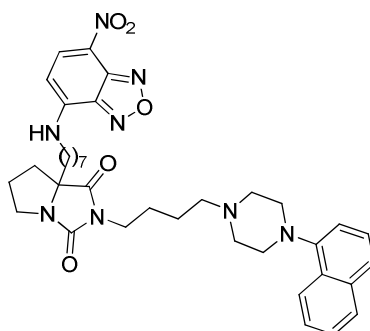
Obtenido a partir de la amina **38** (0.16 mmol) y cloruro de NBD (0.16 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.12. Cromatografía: acetato de etilo. Rto: 50%. P.f. 140-143 °C.



Rf (acetato de etilo): 0.1. IR (ATR, cm^{-1}): 3310 (NH), 1766, 1704 (CONCON), 1583 (NO_2), 1499, 1447 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.54-1.70 (m, 8H, 4CH_2), 1.77-1.92 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.96-2.12 (m, 4H, CH_2 , $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.53 (t a, $J = 7.3$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 2.78 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 3.13-3.24 (m, 5H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.50-3.57 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$, CH_2NH), 3.80 (dt, $J = 11.7$, 7.5, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 6.12 (d, $J = 8.7$, 1H, NBD), 6.88 (s a, 1H, NH), 7.04 (d, $J = 7.3$, 1H, naft), 7.37 (t ap, $J = 7.8$, 1H, naft), 7.42-7.49 (m, 2H, naft), 7.53 (d, $J = 7.5$, 1H, naft), 7.79-7.82 (m, 1H, naft), 8.14-8.18 (m, 1H, naft), 8.42 (d, $J = 8.6$, 1H, NBD). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 21.8, 24.0, 26.0, 26.1, 28.2, 33.3, 34.6 ($(\text{CH}_2)_3$, $(\text{CH}_2)_2$, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 39.0 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 43.8 (CH_2NH), 45.1 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 52.9 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 53.9 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 58.2 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 72.4 (C_{cic}), 98.7 (CH_{NBD}), 114.6 (CH_{naft}), 123.6 (2CH_{naft}), 124.0 (C_{NBD}), 125.4 (CH_{naft}), 125.9 (2CH_{naft}), 128.5 (CH_{naft}), 128.9, 134.8 (2C_{naft}), 136.5 (CH_{NBD}), 143.9, 144.0, 144.3 (3C_{NBD}), 149.5 (C_{naft}), 160.8 (NCNO), 176.3 (CON). MS (ESI): 641.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ Anal. ($\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{N}_8\text{O}_5 \cdot 2\text{HCl} \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) C, H, N, S.

3.1.23.8. 2-{4-[4-(1-Naftil)piperazin-1-il]butil}-7a-{7-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]heptil}tetrahydro-1H-pirrol[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 16

Obtenido a partir de la amina **39** (0.12 mmol) y cloruro de NBD (0.12 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.12. Cromatografía: acetato de etilo. Rto: 51%. P.f. 127-130 °C.



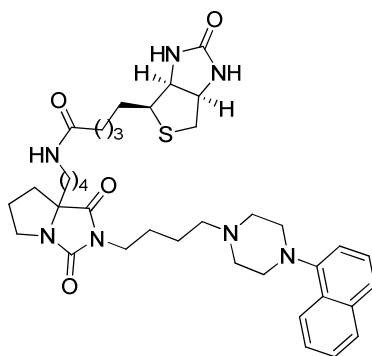
Rf (acetato de etilo): 0.1. IR (ATR, cm^{-1}): 3308 (NH), 1766, 1704 (CONCON), 1584 (NO_2), 1498, 1447 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.34-1.46 (m, 7H, 3CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.53-1.78 (m, 8H, 4CH_2), 1.82-1.93 (m, 3H, CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.98-2.12 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.49 (t a, $J = 7.3$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 2.71 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 3.11 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 3.18 (ddd, $J = 11.9$, 7.7, 6.1, 1H,

1/2CH_{2cic}N), 3.48-3.56 (m, 4H, CH₂N(CO)₂, CH₂NH), 3.77 (dt, $J = 11.7, 7.4$, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 6.05 (d, $J = 8.7$, 1H, NBD), 6.50 (m, 1H, NH), 7.04 (d, $J = 7.2$, 1H, naft), 7.35 (t ap, $J = 7.8$, 1H, naft), 7.39-7.53 (m, 3H, naft), 7.74-7.78 (m, 1H, naft), 8.12-8.15 (m, 1H, naft), 8.39 (d, $J = 8.7$, 1H, NBD). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): 23.9, 24.0, 26.1, 26.2, 26.8, 28.5, 29.1, 29.3, 33.2, 35.0 ((CH₂)₆, (CH₂)₂, 2CH_{2cic}), 38.9 (CH₂N(CO)₂), 44.0 (CH₂NH), 44.9 (CH_{2cic}N), 53.0 (2CH_{2pip}NAr), 53.7 (2CH_{2pip}), 58.2 (CH_{2Npip}), 72.5 (C_{cic}), 98.6 (CH_{NBD}), 114.6, 123.5, 123.6 (3CH_{naft}), 123.8 (C_{NBD}), 125.4 (CH_{naft}), 125.9 (2CH_{naft}), 128.4 (CH_{naft}), 128.9, 134.8 (2C_{naft}), 136.6 (CH_{NBD}), 144.0 (2C_{NBD}), 144.3 (C_{NBD}), 149.7 (C_{naft}), 160.8 (NCON), 176.5 (CON). MS (ESI): 683.3 [M+H]⁺ Anal. (C₃₇H₄₆N₈O₅·2HCl) C, H, N, S.

3.1.24. Compuestos marcados con biotina 17-20

3.1.24.1. (+)-N-{4-[2-{4-[4-(1-Naftil)piperazin-1-il]butil}-1,3-dioxotetrahidro-1H-pirrolol[1,2-c]imidazol-7a(5H)-il]butil}biotinamida, 17

Obtenido a partir de la amina **38** (0.16 mmol) y biotina (0.31 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.13, método A. Cromatografía: diclorometano/etanol/amoniaco 9:1:0.1. Rto: 55%. P.f. 70-71 °C. $[\alpha]_D^{20}$: +21.8 (c = 0.51, metanol).

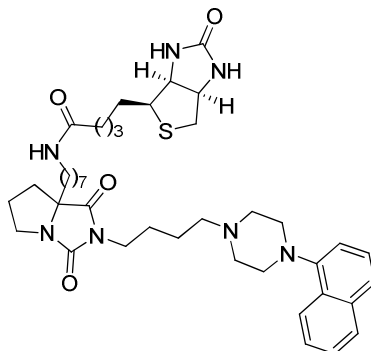


R_f (diclorometano/etanol 8:2): 0.3. IR (ATR, cm⁻¹): 3271 (NH), 1766, 1702 (CONCON, CONH, NHCONH), 1548, 1449 (Ar). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.35-1.65 (m, 15H, 7CH₂, 1/2CH_{2cic}), 1.79-1.94 (m, 3H, CH₂, 1/2CH_{2cic}), 1.98-2.08 (m, 2H, CH_{2cic}), 2.15 (t, $J = 7.4$, 2H, CH₂CO), 2.50 (t, $J = 6.8$, 2H, CH_{2Npip}), 2.67-2.71 (m, 5H, 2CH_{2pip}, 1/2CH₂S), 2.85 (dd, $J = 12.8, 5.7$, 1H, 1/2CH₂S), 3.05-3.28 (m, 8H, 2CH_{2pip}NAr, 1/2CH_{2cic}N, CH₂NH, CHS), 3.42-3.57 (m, 2H, CH₂N(CO)₂), 3.74 (dt, $J = 14.3, 7.3$, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 4.24 (dd, $J = 7.3, 4.7$, 1H, CHNH), 4.45 (dd, $J = 6.9, 5.0$, 1H, CHNH), 5.77 (s a, 1H, NH), 6.46 (s a, 1H, NH), 6.70 (s a, 1H, NH), 7.06 (d, $J = 7.3$, 1H, Ar), 7.38 (t, $J = 7.8$, 1H, Ar), 7.41-7.48 (m, 2H, Ar), 7.52 (d, $J = 7.2$, 1H, Ar), 7.79-7.82 (m, 1H, Ar), 8.14-8.17 (m, 1H, Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): 21.3, 24.0, 25.9 (3CH₂), 26.1 (2CH₂), 28.2, 28.3, 29.3, 33.1, 34.5 (5CH₂), 36.1 (CH₂CO), 38.9, 39.1, 40.6 (CH₂N(CO)₂, CH₂NH, CH₂S), 44.9 (CH_{2cic}N), 52.9 (2CH_{2pip}NAr), 53.8 (2CH_{2pip}), 55.7 (CHS), 58.2 (CH_{2Npip}), 60.3, 61.8 (2CHNH), 72.4 (C_{cic}), 114.7 (CH_{Ar}), 123.6 (2CH_{Ar}), 125.4, 125.9, 126.0, 128.5

(4CH_{Ar}), 128.9, 134.8, 149.6 (3C_{Ar}), 160.7 (NCON), 164.1 (NHCONH), 173.4 (CONH), 176.5 (CON). HPLC (Gradiente II, t_R, min): 15.3. MS (ESI): 352.3 [(M+2H)/2]⁺, 703.5 [M+H]⁺. Anal. (C₃₈H₅₃N₇O₄S·2HCl·7/2H₂O) C, H, N, S.

3.1.24.2. (+)-N-{7-[2-{4-[4-(1-Naftil)piperazin-1-il]butil}-1,3-dioxotetrahidro-1H-pirrol-1,2-c]imidazol-7a(5H)-il]heptil}biotinamida, 18

Obtenido a partir de la amina **39** (0.12 mmol) y biotina (0.25 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.13, método A. Cromatografía: diclorometano/etanol/amoniaco 9:1:0.1. Rto: 50%. P.f. 83-90 °C. [α]_D²⁰: +25.0 (c = 0.50, metanol).

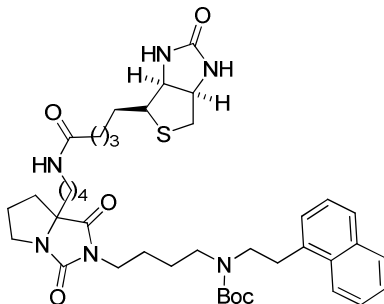


R_f (diclorometano/etanol 8:2): 0.3. IR (ATR, cm⁻¹): 3287 (NH), 1766, 1703, 1649 (CONCON, CONH, NHCONH), 1547, 1449 (Ar). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.34-1.67 (m, 21H, 10CH₂, 1/2CH_{2cic}), 1.80-1.89 (m, 3H, CH₂, 1/2CH_{2cic}), 1.98-2.08 (m, 2H, CH_{2cic}), 2.14 (t, J = 7.4, 2H, CH₂CO), 2.49 (t, J = 7.1, 2H, CH₂N_{pip}), 2.68-2.72 (m, 5H, 2CH_{2pip}, 1/2CH_{2S}), 2.88 (dd, J = 12.8, 4.8, 1H, 1/2CH_{2S}), 3.06-3.22 (m, 8H, 2CH_{2pip}NAr, 1/2CH_{2cic}N, CH₂NH, CHS), 3.45-3.55 (m, 2H, CH₂N(CO)₂), 3.75 (dt, J = 11.6, 7.3, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 4.25 (dd, J = 7.4, 4.7, 1H, CHNH), 4.46 (dd, J = 7.4, 4.8, 1H, CHNH), 5.66 (s a, 1H, NH), 6.04 (t, J = 5.3, 1H, NH), 6.48 (s a, 1H, NH), 7.07 (d, J = 7.1, 1H, Ar), 7.38 (t, J = 7.8, 1H, Ar), 7.41-7.49 (m, 2H, Ar), 7.53 (d, J = 8.2, 1H, Ar), 7.78-7.82 (m, 1H, Ar), 8.15-8.18 (m, 1H, Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): 24.1, 24.2, 26.0, 26.3, 26.4, 27.1, 28.4, 28.5, 29.3, 29.6, 29.8, 33.3, 35.2 ((CH₂)₆, (CH₂)₂, (CH₂)₃, 2CH_{2cic}), 36.3 (CH₂CO), 39.1, 39.7, 40.8 (CH₂N(CO)₂, CH₂NH, CH₂S), 45.1 (CH_{2cic}N), 53.2 (2CH_{2pip}NAr), 53.9 (2CH_{2pip}), 55.9 (CHS), 58.3 (CH₂N_{pip}), 60.5, 62.1 (2CHNH), 72.7 (C_{cic}), 114.9, 123.7, 123.9, 125.6, 126.1, 126.2, 128.7 (7CH_{Ar}), 129.1, 135.0, 149.9 (3C_{Ar}), 161.0 (NCON), 164.2 (NHCONH), 173.4 (CONH), 176.8 (CON). HPLC (Gradiente II, t_R, min): 17.1. MS (ESI): 373.7 [(M+2H)/2]⁺, 746.4 [M+H]⁺. Anal. (C₄₁H₅₉N₇O₄S·2HCl·7/2H₂O) C, H, N, S.

3.1.24.3. (+)-N-{4-[2-(4-{[2-(1-Naftil)etil]amino}butil)-1,3-dioxotetrahidro-1H-pirrol[1,2-c]-imidazol-7a(5H)-il]butil}biotinamida, 19

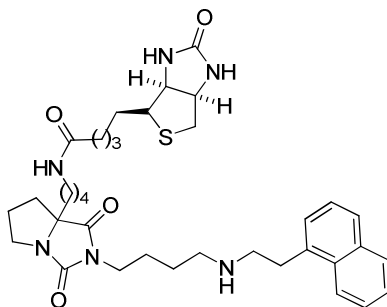
Siguiendo el procedimiento general 3.1.1.13, método C a partir de biotina (0.06 mmol) y la amina protegida **42** (0.04 mmol), se obtiene 4-[1,3-dioxo-7a-[4-(biotinilamino)butil]tetrahidro-1H-pirrol[1,2-c]imidazol-2(3H)-il]butil[2-(1-naftil)etil]carbamato de *tert*-butilo (**44**).

Cromatografía: diclorometano/etanol 9:1. Rto: 70%.



R_f (diclorometano/etanol 9:1): 0.4. IR (ATR, cm⁻¹): 3298 (NH), 1766, 1702 (CONCON, CONH), 1450, 1417 (Ar). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): Mezcla de rotámeros A:B en proporción 3:1; 1.12-1.83 (m, 27H, 8CH₂, CH_{2cic}, 3CH₃), 1.96-2.06 (m, 2H, CH_{2cic}), 2.15-2.19 (m, 2H, CH₂CO), 2.71 (d, *J* = 12.8, 1H, 1/2CH₂S), 2.89 (dd, *J* = 12.8, 4.6, 1H, 1/2CH₂S), 3.11-3.27 (m, 8H, CH₂Ar, CH₂NBoc, CH₂NH, 1/2CH_{2cic}N, CHS), 3.44-3.47 (m, 4H, CH₂N(CO)₂, CH₂NBoc), 3.72 (dt, *J* = 11.5, 7.4, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 4.29-4.32 (m, 1H, CHNH), 4.48-4.52 (m, 1H, CHNH), 5.50 (s a, 1H, NH), 6.14 (m, 1H, NH rotámero B), 6.31-6.32 (m, 1H, NH), 6.62-6.66 (m, 1H, NH rotámero A), 7.27-7.49 (m, 4H, Ar), 7.67-7.74 (m, 1H, Ar), 7.83-7.88 (m, 1H, Ar), 8.08 (d, *J* = 7.8, 1H, Ar rotámero A), 8.18 (d, *J* = 7.8, 1H, Ar rotámero B). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): 21.2, 25.7, 25.8, 25.9, 26.1, 28.2 (6CH₂), 28.5 (3CH₃), 29.2, 31.9, 32.6, 33.2, 34.6 (4CH₂), 36.0 (CH₂CO), 38.7, 39.1, 40.7 (CH₂NHCO, CH₂N(CO)₂, CH₂S), 44.9 (CH_{2cic}N), 47.0, 48.6 (2CH₂NBoc), 55.6 (CHS), 60.4, 61.9 (2CHNH), 72.4 (C_{cic}), 79.7 (C_{Boc}), 123.8 (CH_{Ar}), 125.7 (2CH_{Ar}), 126.1, 127.1, 127.2, 128.9 (4CH_{Ar}), 132.2, 133.9, 135.4 (3C_{Ar}), 155.6 (NCOO), 160.7 (NCON), 163.9 (NHCONH), 173.5 (CONH), 176.4 (CON). HPLC (Gradiente-I, t_R, min): 25.1. MS (ESI): 763.4 [(M+H)]⁺.

Siguiendo el procedimiento general 3.1.1.14, a partir de **44** (0.030 mmol) se obtiene **19**. Rto: 78%. [α]_D²⁰: +18.3 (c = 1.0, cloroformo).

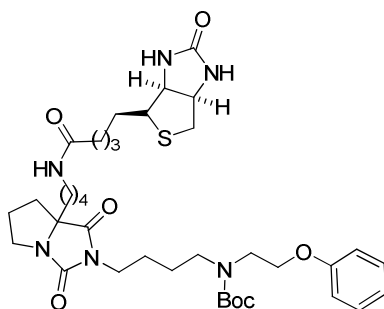


R_f (diclorometano/etanol 1:1): 0.1. IR (ATR, cm⁻¹): 3290 (NH), 1765, 1702 (CONCON, CONH), 1450 (Ar). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.10-1.19 (m, 1H, 1/2CH_{2cic}), 1.34-1.70 (m, 13H, 6CH₂, NH), 1.80-1.90 (m, 3H, CH₂, 1/2CH_{2cic}), 1.97-2.16 (m, 6H, CH₂, CH_{2cic}, CH₂CO), 2.65 (t, *J* = 7.1, 1H, CH₂NH), 2.69 (d, *J* = 12.8, 1H, 1/2CH₂S), 2.87 (dd, *J* = 12.8, 4.9, 1H, 1/2CH₂S), 2.98 (t, *J* = 7.3, 2H, CH₂NH), 3.04-3.29 (m, 6H, CH₂Ar, CH₂NHCO, 1/2CH_{2cic}N, CHS), 3.41-3.52 (m, 2H, CH₂N(CO)₂), 3.69-3.77 (m, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 4.23-4.28 (m, 1H, CHNH), 4.44-4.48 (m, 1H, CHNH), 5.44-5.45 (m, 1H, NH), 6.37 (s a, 1H, NH), 6.57-6.63 (m, 1H, NH), 7.32 (d, *J* = 6.5, 1H, Ar), 7.39 (t, *J* = 7.5, 1H, Ar), 7.44-7.54 (m, 2H, Ar), 7.72 (d, *J* = 9.0, 1H, Ar), 7.83-7.86 (m, 1H, Ar), 8.03 (d, *J* = 8.0, 1H, Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): 21.4, 25.8, 25.9, 26.1, 27.2, 28.2, 29.2, 29.8, 33.2, 33.4, 34.6 (2(CH₂)₃, (CH₂)₂, 2CH_{2cic}, CH₂Ar), 36.2 (CH₂CO), 38.8, 39.1, 40.7 (CH₂NHCO, CH₂N(CO)₂, CH₂S), 44.9 (CH_{2cic}N), 49.5, 50.6 (2CH₂NH), 55.5 (CHS), 60.3, 61.8 (2CHNH), 72.5 (C_{cic}), 123.8, 125.6, 125.7, 126.1, 126.7, 127.2, 128.9 (7CH_{Ar}), 132.0, 134.0, 136.0 (3C_{Ar}), 160.7 (NCON), 163.9 (NHCONH), 173.4 (CONH), 176.5 (CON). HPLC (Gradiente-I, t_R, min): 15.6. MS (ESI): 662.8 [M]⁺. Anal. (C₃₆H₅₀N₆O₄S·2HCl·4H₂O) C, H, N, S.

3.1.24.4. (+)-N-{4-[1,3-Dioxo-2-{4-[(2-fenoxietil)amino]butil}tetrahidro-1H-pirrol[1,2-c]-imidazol-7a(5H)-il]butil}biotinamida, 20

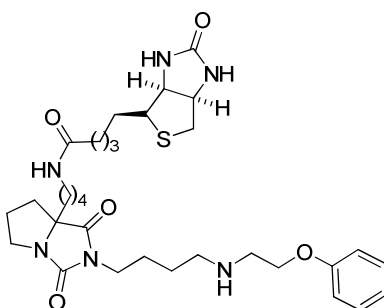
Siguiendo el procedimiento general 3.1.1.13, método C a partir de biotina (0.21 mmol) y la amina protegida **43** (0.14 mmol), se obtiene 4-[1,3-dioxo-7a-[4-(biotinilamino)butil]tetrahidro-1H-pirrol[1,2-c]imidazol-2(3H)-il]butil-(2-fenoxietil)carbamato de *tert*-butilo (**45**).

Cromatografía: diclorometano/etanol 9:1. Rto: 65%. [α]_D²⁰: +17.9 (c = 1.0, cloroformo).



R_f (diclorometano/etanol 9:1): 0.2. IR (ATR, cm⁻¹): 3298 (NH), 1767, 1701 (CONCON, CONH), 1595, 1545, 1451 (Ar). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.10-1.22 (m, 1H, 1/2CH_{2cic}), 1.37-1.74 (m, 23H, 7CH₂, 3CH₃), 1.77-1.92 (m, 3H, CH₂, 1/2CH_{2cic}), 1.97-2.10 (m, 2H, CH_{2cic}), 2.17 (t, *J* = 7.4, 2H, CH₂CO), 2.71 (d, *J* = 12.8, 1H, 1/2CH₂S), 2.89 (dd, *J* = 12.8, 4.8, 1H, 1/2CH₂S), 3.13-3.21 (m, 4H, CH₂NH, 1/2CH_{2cic}N, CHS), 3.31 (m, 2H, CH₂NBoc), 3.46 (m, 2H, CH₂N(CO)₂), 3.54 (m, 2H, CH₂NBoc), 3.74 (dt, *J* = 11.0, 7.6, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 4.04-4.05 (m, 2H, CH₂O), 4.29 (dd, *J* = 7.5, 4.6, 1H, CHNH), 4.50 (dd, *J* = 7.5, 4.7, 1H, CHNH), 5.68 (s a, 1H, NH), 6.59 (s a, 2H, NH), 6.88 (d, *J* = 7.8, 2H, Ar), 6.93 (t, *J* = 6.9, 1H, Ar), 7.24-7.29 (m, 2H, Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): Mezcla de rotámeros, 21.3, 25.6, 25.8, 25.9, 26.1, 28.2, 28.3 (7CH₂), 28.6 (3CH₃), 29.2, 33.2, 34.5 (3CH₂), 36.1 (CH₂CO), 38.8, 39.1 (CH₂N(CO)₂, CH₂NHCO), 40.6 (CH₂S), 44.9 (CH_{2cic}N), 46.9 (CH₂NBoc), 47.9, 48.2 (CH₂NBoc, rotámeros), 55.6 (CHS), 60.4, 61.8 (2CHNH), 66.3, 66.6 (CH₂O, rotámeros), 72.4 (C_{cic}), 79.9 (C_{Boc}), 114.5 (2CH_{Ar}), 121.0 (CH_{Ar}), 129.6 (2CH_{Ar}), 155.4, 155.7 (NCOO, rotámeros), 158.6 (C_{Ar}), 160.7 (NCON), 164.1 (NHCONH), 173.5 (CONH), 176.4 (CON). HPLC (Gradiente-I, t_R, min): 23.5. MS (ESI): 729.4 [M+H]⁺.

Siguiendo el procedimiento general 3.1.1.14, a partir de **45** (0.09 mmol) se obtiene **20**. Rto: 87%. [α]_D²⁰: +14.6 (c = 1.0, cloroformo).



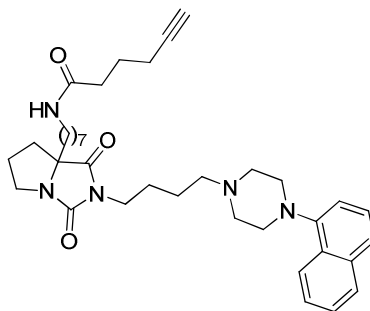
R_f (diclorometano/etanol 1:1): 0.1. IR (ATR, cm⁻¹): 3272 (NH), 1765, 1702 (CONCON, CONH), 1594, 1552, 1451 (Ar). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.09-1.17 (m, 1H, 1/2CH_{2cic}), 1.24-1.75 (m, 14H, 7CH₂), 1.80-1.91 (m, 3H, CH₂, 1/2CH_{2cic}), 1.97-2.08 (m, 2H, CH_{2cic}), 2.13 (t, *J* = 7.4, 2H, CH₂CO), 2.27 (s a, 1H, NH), 2.67-2.72 (m, 3H, CH₂NH, 1/2CH₂S), 2.88 (dd, *J* =

12.8, 4.8, 1H, $1/2\text{CH}_2\text{S}$), 2.99 (t, $J = 5.1$, 2H, CH_2NH), 3.03-3.26 (m, 4H, CH_2NHCO , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$, CHS), 3.40-3.54 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.69-3.77 (m, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 4.05 (t, $J = 5.1$, 2H, CH_2O), 4.27 (dd, $J = 7.4$, 4.7, 1H, CHNH), 4.47 (dd, $J = 7.6$, 4.8, 1H, CHNH), 5.60 (s a, 1H, NH), 6.49 (s a, 1H, NH), 6.63-6.68 (m, 1H, NH), 6.88 (d, $J = 7.9$, 2H, Ar), 6.93 (t, $J = 7.4$, 1H, Ar), 7.26 (t, $J = 8.0$, 2H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 21.4, 25.8, 25.9, 26.1, 27.1, 28.2, 28.3, 29.1, 33.2, 34.6 ($2(\text{CH}_2)_3$, $(\text{CH}_2)_2$, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 36.1 (CH_2CO), 38.8, 39.1 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$, CH_2NHCO), 40.7 (CH_2S), 44.9 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 48.9, 49.4 ($2\text{CH}_2\text{NH}$), 55.7 (CHS), 60.3, 61.9 (2CHNH), 66.9 (CH_2O), 72.5 (C_{cic}), 114.6 (2CH_{Ar}), 121.0 (CH_{Ar}), 129.6 (2CH_{Ar}), 158.8 (C_{Ar}), 160.7 (NCON), 164.0 (NHCONH), 173.4 (CONH), 176.6 (CON). HPLC (Gradiente-I, t_R , min): 17.2. MS (ESI): 629.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Anal. ($\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}\cdot\text{HCl}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$) C, H, N, S.

3.1.25. Compuestos marcados con alquino 21, 22

3.1.25.1. *N*-{7-[2-{4-[4-(1-Naftil)piperazin-1-il]butil}-1,3-dioxotetrahidro-1*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-7a(5*H*)-il]heptil}-5-hexinamida, 21

Obtenido a partir de la amina **39** (0.13 mmol) y ácido 5-hexinoico (0.19 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.13, método B. Cromatografía: diclorometano/etanol 98:2. Rto: 46%. P.f. 50-55 °C.

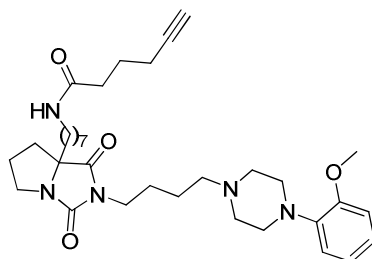


Rf (diclorometano/etanol 95:5): 0.5. IR (ATR, cm^{-1}): 3298 (NH), 1767, 1706, 1664 (CONCON, CONH), 1443, 1446 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.06-1.65 (m, 15H, 7CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.82-1.92 (m, 5H, 2CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.97 (t, $J = 2.6$, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.00-2.09 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.24 (td, $J = 7.0$, 2.6, 2H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.26 (t, $J = 7.4$, 2H, CH_2CO), 2.50 (t, $J = 7.6$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 2.74 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 3.14-3.22 (m, 7H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$, CH_2NH , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.45-3.56 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.77 (ddd, $J = 11.7$, 8.0, 6.7, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 5.50 (s a, 1H, NH), 7.08 (d, $J = 6.9$, 1H, Ar), 7.39 (t ap, $J = 7.8$, 1H, Ar), 7.42-7.50 (m, 2H, Ar), 7.53 (d, $J = 8.2$, 1H, Ar), 7.79-7.83 (m, 1H, Ar), 8.17-8.20 (m, 1H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 17.9 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 23.9, 24.0, 24.3, 26.1, 26.2, 26.8, 29.1, 29.4, 29.7, 33.2, 35.1, 35.2 ($(\text{CH}_2)_6$, $2(\text{CH}_2)_2$, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 38.9 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 39.5 (CH_2NH), 45.0 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 53.0 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 53.8 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 58.2 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 69.2 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 72.5 (C_{cic}), 83.7 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 114.8, 123.6, 123.7, 125.4, 125.9, 126.0, 128.5 (7CH_{Ar}), 129.0, 134.8, 149.8 (3C_{Ar}), 160.8 (NCON), 172.2 (CONH), 176.6 (CON). HPLC

(Gradiente-I, t_R , min): 18.0. MS (ESI): 307.7 $[(M+2H)/2]^+$, 614.4 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{37}H_{51}N_5O_3 \cdot 2HCl \cdot 1/2H_2O$) C, H, N, S.

3.1.25.2. *N*-{7-[2-{4-[4-(2-Metoxifenil)piperazin-1-il]butil}-1,3-dioxotetrahidro-1*H*-pirrolo-[1,2-*c*]imidazol-7a(5*H*)-il]heptil}-5-hexinamida, 22

Obtenido a partir de la amina **41** (0.10 mmol) y ácido 5-hexinoico (0.15 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.13, método B. Cromatografía: diclorometano/etanol 95:5. Rto: 60%. P.f. 121-124 °C.

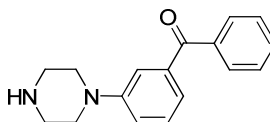


R_f (diclorometano/etanol 95:5): 0.5. IR (ATR, cm^{-1}): 3292 (NH), 1767, 1706, 1654 (CONCON, CONH), 1546, 1501, 1447 (Ar). 1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$, δ): 1.08-1.24 (m, 9H, $4CH_2$, $1/2CH_{2cic}$), 1.41-1.63 (m, 7H, $3CH_2$, $1/2CH_{2cic}$), 1.78-1.87 (m, 4H, $2CH_2$), 1.94 (t, $J = 2.6$, 1H, $C\equiv CH$), 1.98-2.05 (m, 2H, CH_{2cic}), 2.20 (td, $J = 6.8$, 2.6, 2H, $CH_2C\equiv CH$), 2.24 (t, $J = 7.3$, 2H, CH_2CO), 2.39 (t, $J = 7.3$, 2H, $CH_{2N_{pip}}$), 2.60 (m, 4H, $2CH_{2pip}$), 3.05 (m, 4H, $2CH_{2pip}NAr$), 3.10-3.21 (m, 3H, CH_2NH , $1/2CH_{2cic}N$), 3.40-3.51 (m, 2H, $CH_2N(CO)_2$), 3.73 (ddd, $J = 11.7$, 8.0, 6.7, 1H, $1/2CH_{2cic}N$), 3.82 (s, 3H, CH_3), 5.65 (s a, 1H, NH), 6.81-6.99 (m, 4H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$, δ): 17.8 ($CH_2C\equiv CH$), 23.8, 23.9, 24.2, 26.0, 26.1, 26.7, 29.0, 29.3, 29.6, 33.1, 35.0, 35.1 ($(CH_2)_6$, $2(CH_2)_2$, $2CH_{2cic}$), 38.8 ($CH_2N(CO)_2$), 39.4 (CH_2NH), 44.8 ($CH_{2cic}N$), 50.6 ($2CH_{2pip}NAr$), 53.4 ($2CH_{2pip}$), 55.4 (CH_3), 58.1 ($CH_{2N_{pip}}$), 69.2 ($C\equiv CH$), 72.4 (C_{cic}), 83.6 ($C\equiv CH$), 111.2, 118.2, 121.0, 122.9 ($4CH_{Ar}$), 141.3, 152.3 ($2C_{Ar}$), 160.7 (NCON), 172.2 (CONH), 176.5 (CON). HPLC (Gradiente-I, t_R , min): 19.7. MS (ESI): 297.8 $[(M+2H)/2]^+$, 594.5 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{34}H_{51}N_5O_4 \cdot 2HCl \cdot H_2O$) C, H, N, S.

3.1.26. Piperazinilbenzofenonas 68, 69

3.1.26.1. Fenil(3-piperazin-1-ilfenil)metanona, 68

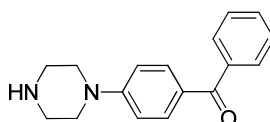
Obtenido a partir de 3-bromobenzofenona (0.50 mmol) y piperazina (2.0 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.2. Cromatografía: diclorometano/metanol 10:0 a 8:2. Rto: 98%.



Rf (acetato de etilo/etanol/amoniaco 8:2:0.1): 0.1. IR (ATR, cm^{-1}): 3058 (NH), 1655 (CO), 1595, 1447 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 3.06-3.09 (m, 4H, $2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.22-3.25 (m, 4H, $2\text{CH}_2\text{NAr}$), 3.66 (s a, 1H, NH), 7.14 (ddd, $J = 8.2, 2.6, 0.9$, 1H, Ar), 7.21 (dt, $J = 7.5, 1.2$, 1H, Ar), 7.35 (t, $J = 7.9$, 1H, Ar), 7.37 (m, 1H, Ar), 7.45-7.51 (m, 2H, Ar), 7.59 (m, 1H, Ar), 7.79-7.83 (m, 2H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 45.4 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 49.4 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 116.7, 119.9, 121.7 (3CH_{Ar}), 128.1 (2CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 129.9 (2CH_{Ar}), 132.2 (CH_{Ar}), 137.6, 138.2, 151.3 (3C_{Ar}), 196.9 (CO). MS (ESI): 267.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.1.26.2. Fenil(4-piperazin-1-ilfenil)metanona, 69

Obtenido a partir de 4-bromobenzofenona (0.50 mmol) y piperazina (2.0 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.2. Cromatografía: diclorometano/metanol 10:0 a 8:2. Rto: 92%.

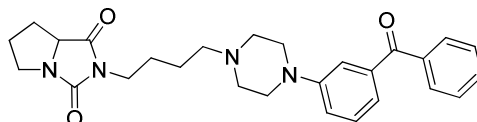


Rf (acetato de etilo/etanol/amoniaco 7:3:0.1): 0.1. IR (ATR, cm^{-1}): 3327, 3056 (NH), 1641 (CO), 1595, 1549, 1517, 1447 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 2.50 (s a, 1H, NH), 3.04-3.07 (m, 4H, $2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.34-3.37 (m, 4H, $2\text{CH}_2\text{NAr}$), 6.89 (d, $J = 8.9$, 2H, Ar), 7.45 (t, $J = 7.3$, 2H, Ar), 7.54 (t, $J = 7.3$, 1H, Ar), 7.73 (d, $J = 7.9$, 2H, Ar), 7.79 (d, $J = 9.0$, 2H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 45.8 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 48.4 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 113.5 (2CH_{Ar}), 127.4 (C_{Ar}), 128.2 (2CH_{Ar}), 129.7 (2CH_{Ar}), 131.6 (CH_{Ar}), 132.6 (2CH_{Ar}), 138.9, 154.4 (2C_{Ar}), 195.4 (CO). HPLC (Gradiente-I, t_{R} , min): 17.5. MS (ESI): 267.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.1.27. Derivados de benzofenona 66, 67, 71, 85

3.1.27.1. 2-{4-[4-(3-Benzoilfenil)piperazin-1-il]butil}tetrahidro-1H-pirrol-1,3(2H)-diona, 66

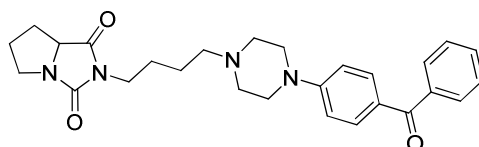
Obtenido a partir del bromoderivado **24** (0.63 mmol) y la piperazina **68** (0.82 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.3. Cromatografía: acetato de etilo. Rto: 89%.



Rf (acetato de etilo/etanol 9:1): 0.3. IR (ATR, cm^{-1}): 1771, 1713 (CONCON), 1658 (CO), 1595, 1575, 1445 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.48-1.75 (m, 5H, $(\text{CH}_2)_2$, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.99-2.12 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.25 (m, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.41 (t, $J = 7.4$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 2.59 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 3.24 (m, 5H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.50 (t, $J = 7.0$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.68 (dt, $J = 11.2$, 7.7, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 4.07 (dd, $J = 9.0$, 7.5, 1H, CH_{cic}), 7.13 (ddd, $J = 8.2$, 2.6, 1.0, 1H, Ar), 7.19 (dt, $J = 7.5$, 1.4, 1H, Ar), 7.34 (t, $J = 7.8$, 1H, Ar), 7.36 (m, 1H, Ar), 7.44-7.50 (m, 2H, Ar), 7.59 (m, 1H, Ar), 7.79-7.83 (m, 2H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 23.9, 25.9, 26.9, 27.5 ($(\text{CH}_2)_2$, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 38.7 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 45.4 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 48.7 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 53.0 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 57.8 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 63.2 (CH_{cic}), 116.6, 119.7, 121.4 (3CH_{Ar}), 128.1 (2CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 130.0 (2CH_{Ar}), 132.2 (CH_{Ar}), 137.7, 138.3, 151.1 (3C_{Ar}), 160.7 (NCON), 173.9 (CON), 197.0 (CO). HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 461.2547; encontrado: 461.2550. Anal. ($\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{HCl} \cdot 5/2\text{H}_2\text{O}$) C, H, N.

3.1.27.2. 2-{4-[4-(4-Benzoilfenil)piperazin-1-il]butil}tetrahydro-1H-pirrol-1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 67

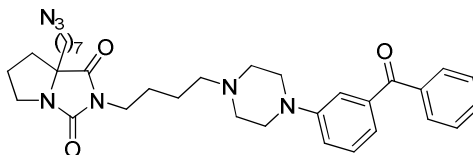
Obtenido a partir del bromoderivado **24** (1.5 mmol) y la piperazina **69** (1.9 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.3. Cromatografía: acetato de etilo/etanol 10:0 a 95:5. Rto: 58%.



Rf (acetato de etilo/etanol 9:1): 0.2. IR (ATR, cm^{-1}): 1769, 1708, 1643 (CONCON), 1595, 1549, 1517, 1445 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.55-1.75 (m, 5H, $(\text{CH}_2)_2$, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.99-2.17 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.20-2.28 (m, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.45 (t, $J = 6.9$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 2.61 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 3.24 (ddd, $J = 11.3$, 7.8, 5.0, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.38-3.41 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 3.50 (t, $J = 6.6$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.68 (dt, $J = 11.2$, 7.7, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 4.07 (dd, $J = 9.0$, 7.6, 1H, CH_{cic}), 6.89 (d, $J = 9.0$, 2H, Ar), 7.45 (t, $J = 7.3$, 2H, Ar), 7.54 (t, $J = 7.3$, 1H, Ar), 7.73 (d, $J = 6.9$, 2H, Ar), 7.79 (d, $J = 8.9$, 2H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 26.1, 27.1, 27.7, 29.8 ($(\text{CH}_2)_2$, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 38.8 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 45.6 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 47.3 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 52.8 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 57.9 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 63.5 (CH_{cic}), 113.4 (2CH_{Ar}), 127.3 (C_{Ar}), 128.2 (2CH_{Ar}), 129.7 (2CH_{Ar}), 131.6 (CH_{Ar}), 132.6 (2CH_{Ar}), 138.9, 154.0 (2C_{Ar}), 160.9 (NCON), 174.1 (CON), 195.4 (CO). HPLC (Gradiente-I, t_{R} , min): 19.1. MS (ESI): 460.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Anal. ($\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) C, H, N.

3.1.27.3. 7a-(7-Azidoheptil)-2-{4-[4-(3-benzoilfenil)piperazin-1-il]butil}tetrahidro-1H-pirrolol[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 71

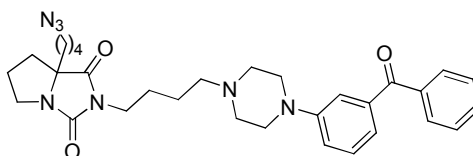
Obtenido a partir del bromoderivado **70** (0.13 mmol) y la piperazina **68** (0.22 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.3. Cromatografía: diclorometano/etanol 99:1 a 95:5 Rto: 79%. Aceite.



Rf (diclorometano/etanol 95:5): 0.5. IR (ATR, cm^{-1}): 2095 (N_3), 1769, 1708 (CONCO), 1658 (CO), 1596, 1487, 1443 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.05-1.34 (m, 9H, 4CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.46-1.68 (m, 6H, 3CH_2), 1.80-1.90 (m, 3H, CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.97-2.10 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.39 (t, $J = 7.3$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 2.56 (t ap, $J = 4.9$, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 3.16 (ddd, $J = 11.7$, 8.0, 6.0, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.19-3.24 (m, 6H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$, CH_2N_3), 3.40-3.55 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.75 (ddd, $J = 11.7$, 8.1, 6.5, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 7.11 (dd, $J = 8.2$, 1.9, 1H, Ar), 7.16 (d, $J = 7.6$, 1H, Ar), 7.31 (t, $J = 7.9$, 1H, Ar), 7.34 (s a, 1H, Ar), 7.45 (t, $J = 7.4$, 2H, Ar), 7.55 (t, $J = 7.4$, 1H, Ar), 7.78 (d, $J = 7.0$, 2H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 23.8, 24.0 (2CH_2), 26.1 (2CH_2), 26.6, 28.8, 29.0, 29.3, 33.1, 35.1 (6CH_2), 38.8 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 44.9 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 48.9 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 51.4 (CH_2N_3), 53.1 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 57.9 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 72.4 (C_{cic}), 116.7, 119.8, 121.5 (3CH_{Ar}), 128.2 (2CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 130.1 (2CH_{Ar}), 132.3 (CH_{Ar}), 137.9, 138.5, 151.3 (3C_{Ar}), 160.7 (NCON), 176.5 (CON), 197.1 (CO). HPLC (Gradiente-I, t_{R} , min): 23.3. MS (ESI): 600.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.1.27.4. 7a-(4-Azidobutil)-2-{4-[4-(3-benzoilfenil)piperazin-1-il]butil}tetrahidro-1H-pirrolol[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 85

Obtenido a partir del bromoderivado **56** (0.15 mmol) y la piperazina **68** (0.26 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.3. Cromatografía: diclorometano/metanol 10:0 a 95:5. Rto: 85%. Aceite.



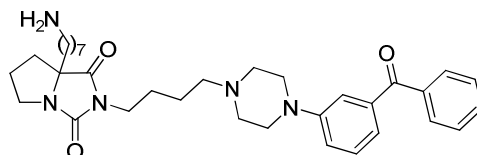
Rf (diclorometano/etanol 95:5): 0.3. IR (ATR, cm^{-1}): 2096 (N_3), 1769, 1707 (CONCON), 1657 (CO), 1596, 1487, 1443 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.14-1.29 (m, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.45-1.95 (m, 11H, (CH_2)₃, (CH_2)₂, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.98-2.09 (m, 2H, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.39 (t, $J = 7.3$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 2.57 (t ap, $J = 4.8$, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 3.16 (ddd, $J = 11.8$, 7.8, 6.3, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.20-3.26 (m, 6H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$, CH_2N_3), 3.42-3.52 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.75 (ddd, $J = 11.7$, 8.0, 6.8,

^1H , $1/2\text{CH}_{2\text{cicN}}$, 7.10 (dd, $J = 8.0, 2.0$, 1H, Ar), 7.16 (d, $J = 7.6$, 1H, Ar), 7.29 (d, $J = 7.9$, 1H, Ar), 7.33 (m, 1H, Ar), 7.41-7.46 (m, 2H, Ar), 7.54 (t, $J = 7.3$, 1H, Ar), 7.76-7.79 (m, 2H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 21.3, 23.9 (2CH_2), 26.0 (2CH_2), 28.7, 33.1, 34.5 (3CH_2), 38.8 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 44.9 ($\text{CH}_{2\text{cicN}}$), 48.8 ($2\text{CH}_{2\text{pipNAr}}$), 51.2 (CH_2N_3), 53.0 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 57.9 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 72.2 (C_{cic}), 116.7, 119.8, 121.5 (3CH_{Ar}), 128.2 (2CH_{Ar}), 128.8 (CH_{Ar}), 130.1 (2CH_{Ar}), 132.3 (CH_{Ar}), 137.8, 138.4, 151.3 (3C_{Ar}), 160.6 (NCON), 176.2 (CON), 197.1 (CO). HPLC (Gradiente-I, t_{R} , min): 20.5. MS (ESI): 558.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.1.28. 7a-(ω -Aminoalquil)biciclohidantoínas 72, 86

3.1.28.1. 7a-(7-Aminoheptil)-2-{4-[4-(3-benzoilfenil)piperazin-1-il]butil}tetrahidro-1H-pirrólo[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 72

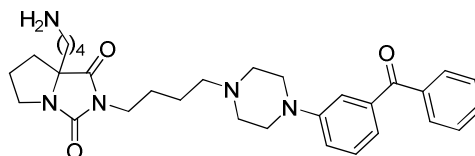
Obtenido a partir de la azida **71** (0.10 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.9. Rto: 84%. Aceite.



IR (ATR, cm^{-1}): 3461 (NH_2), 1768, 1707 (CONCON), 1657 (CO), 1596, 1487, 1443 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.11-1.42 (m, 9H, 3CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$, NH_2), 1.45-1.68 (m, 8H, 4CH_2), 1.79-1.90 (m, 3H, $3/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.97-2.10 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.39 (t, $J = 7.3$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 2.57 (t ap, $J = 4.8$, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 2.64 (t, $J = 6.9$, 2H, CH_2NH_2), 3.16 (ddd, $J = 11.7, 8.0, 6.0$, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cicN}}$), 3.21-3.24 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 3.40-3.55 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.75 (ddd, $J = 11.7, 8.1, 6.6$, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cicN}}$), 7.11 (dd, $J = 8.2, 2.4$, 1H, Ar), 7.16 (dt, $J = 7.6, 1.1$, 1H, Ar), 7.32 (t, $J = 7.9$, 1H, Ar), 7.34 (s a, 1H, Ar), 7.45 (t, $J = 7.4$, 2H, Ar), 7.56 (t, $J = 7.4$, 1H, Ar), 7.78 (d, $J = 7.0$, 2H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 23.9, 24.0 (2CH_2), 26.1 (2CH_2), 26.8, 29.4, 29.5, 33.1, 33.7, 35.1 (6CH_2), 38.8 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 42.2 (CH_2NH_2), 44.9 ($\text{CH}_{2\text{cicN}}$), 48.9 ($2\text{CH}_{2\text{pipNAr}}$), 53.1 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 58.0 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 72.5 (C_{cic}), 116.7, 119.8, 121.6 (3CH_{Ar}), 128.3 (2CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 130.1 (2CH_{Ar}), 132.4 (CH_{Ar}), 137.9, 138.5, 151.4 (3C_{Ar}), 160.8 (NCON), 176.6 (CON), 197.2 (CO). HPLC (Gradiente-I, t_{R} , min): 16.8. MS (ESI): 287.7 $[(\text{M}+2\text{H})/2]^+$, 574.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.1.28.2. 7a-(4-Aminobutil)-2-{4-[4-(3-benzoilfenil)piperazin-1-il]butil}tetrahidro-1H-pirrólo[1,2-c]imidazol-1,3(2H)-diona, 86

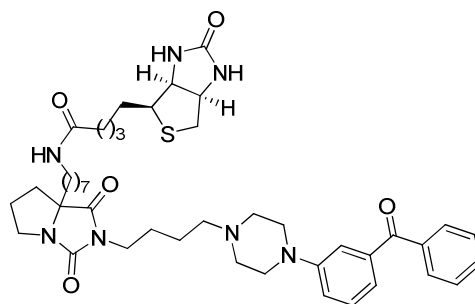
Obtenido a partir de la azida **85** (0.16 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.9. Rto: 66%. Aceite.



IR (ATR, cm^{-1}): 2941 (NH_2), 1768, 1707 (CONCON), 1657 (CO), 1595, 1487, 1444 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.09-1.18 (m, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.35-1.65 (m, 8H, 4CH_2), 1.80-1.93 (m, 3H, CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.97-2.07 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.38 (t, $J = 7.2$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 2.54-2.57 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 2.64 (m, 2H, CH_2NH_2), 3.15 (ddd, $J = 11.7$, 8.2, 6.2, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.20-3.23 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 3.42-3.52 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.75 (ddd, $J = 11.7$, 8.0, 7.1, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 7.11 (dd, $J = 8.2$, 1.7, 1H, Ar), 7.16 (d, $J = 7.5$, 1H, Ar), 7.28-7.34 (m, 2H, Ar), 7.44 (t, $J = 7.3$, 2H, Ar), 7.55 (t, $J = 7.3$, 1H, Ar), 7.78 (d, $J = 7.7$, 2H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 21.6, 24.3 (2CH_2), 26.4 (2CH_2), 33.5, 33.8, 35.2 (3CH_2), 39.2 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 42.2 (CH_2NH_2), 45.2 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 49.2 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 53.4 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 58.3 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 72.8 (C_{cic}), 117.1, 120.1, 121.9 (3CH_{Ar}), 128.6 (2CH_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 130.4 (2CH_{Ar}), 132.7 (CH_{Ar}), 138.2, 138.8, 151.6 (3C_{Ar}), 161.0 (NCON), 176.8 (CON), 197.5 (CO). HPLC (Gradiente-I, t_{R} , min): 15.5. MS (ESI): 266.7 $[(\text{M}+2\text{H})/2]^+$, 532.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.1.29. (+)-N-{7-[2-[4-[4-(3-Benzoilfenil)piperazin-1-il]butil]-1,3-dioxotetrahidro-1H-pirrololo[1,2-c]imidazol-7a(5H)-il]heptil}biotinamida, 61

Obtenido a partir de la amina **72** (0.080 mmol) y biotina (0.12 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.13, método C. Cromatografía: diclorometano/etanol 95:5. Rto: 53%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +12.6$ ($c = 1.0$ cloroformo)

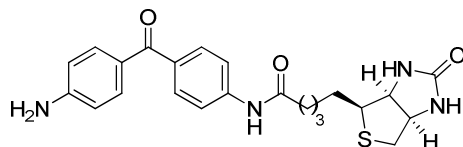


Rf (diclorometano/etanol 8:2): 0.5. IR (ATR, cm^{-1}): 3286 (NH), 1767, 1703 (CONCON), 1655 (CO), 1596, 1573, 1545 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 0.82-1.71 (m, 20H, 10CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.81-1.90 (m, 3H, CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.02-2.09 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.17 (t, $J = 7.4$, 2H, CH_2CO), 2.46 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 2.64 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 2.72 (d, $J = 12.8$, 1H, $1/2\text{CH}_2\text{S}$), 2.89 (dd, $J = 12.8$, 4.9, 1H, $1/2\text{CH}_2\text{S}$), 3.09-3.27 (m, 8H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$, CH_2NHCO , CHS), 3.43-3.54 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.75 (dt, $J = 11.0$, 7.6, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 4.29 (dd, $J = 7.2$, 5.1, 1H,

CHNH), 4.49 (dd, $J = 7.6, 4.9$, 1H, CHNH), 5.43 (s a, 1H, NH), 6.08 (s a, 1H, NH), 6.20 (s a, 1H, NH), 7.13 (dd, $J = 8.2, 1.8$, 1H, Ar), 7.18 (dt, $J = 7.6, 1.1$, 1H, Ar), 7.32 (t, $J = 7.9$, 1H, Ar), 7.36 (s a, 1H, Ar), 7.47 (t, $J = 7.4$, 2H, Ar), 7.58 (t, $J = 7.4$, 1H, Ar), 7.79 (d, $J = 7.0$, 2H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 24.0, 25.8, 26.0, 26.1, 26.9, 28.2, 28.3, 29.2, 29.5, 29.7, 29.8, 33.2, 35.1 ((CH_2)₆, (CH_2)₃, (CH_2)₂, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 36.1 (CH_2CO), 38.8 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 39.5 (CH_2NHCO), 40.7 (CH_2S), 44.9 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 48.7 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 53.0 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 55.6 (CHS), 57.9 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 60.3, 61.9 (2CHN), 72.6 (C_{cic}), 116.8, 120.0, 121.8 (3CH_{Ar}), 128.4 (2CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 130.2 (2CH_{Ar}), 132.5 (CH_{Ar}), 137.9, 138.5, 151.3 (3C_{Ar}), 160.8 (NCON), 163.8 (NHCONH), 173.2 (CONH), 176.6 (CON), 197.4 (CO). HPLC (Gradiente-I, t_R , min): 22.3. MS (ESI): 400.5 [(M+2H)/2]⁺, 799.8 [M+H]⁺. Anal. ($\text{C}_{44}\text{H}_{61}\text{N}_7\text{O}_5\text{S}\cdot\text{HCl}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) C, H, N, S.

3.1.30. (+)-N-[4-(4-Aminobenzoi)fenil]biotinamida, **77**⁸⁹

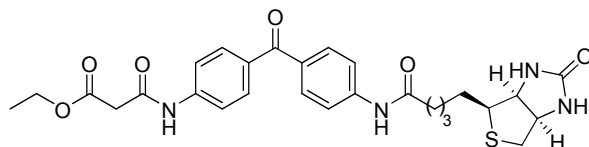
Obtenido a partir de 4,4'-diaminobenzofenona (2.4 mmol) y biotina (1.2 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.13, método A. Cromatografía en columna: diclorometano/metanol 9:1 a 7:3. Rto: 97%. P.f. 172-175 °C. $[\alpha]_D^{20}$: +41.0 ($c = 0.90$, DMSO).



Rf (diclorometano/etanol/amoniaco 95:5:1): 0.1. ^1H -RMN (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ): 1.32-1.67 (m, 6H, (CH_2)₃), 2.36 (t, $J = 7.3$, CH_2CO), 2.58 (d, $J = 12.4$, 1H, $1/2\text{CH}_2\text{S}$), 2.83 (dd, $J = 12.4, 5.1$, 1H, $1/2\text{CH}_2\text{S}$), 3.10-3.16 (m, 1H, CHS), 4.12-4.16 (m, 1H, CHNH), 4.29-4.33 (m, 1H, CHNH), 6.09 (s a, 2H, NH_2), 6.37 (s a, 1H, NH), 6.45 (s a, 1H, NH), 6.59 (d, $J = 8.7$, 2H, Ar), 7.50 (d, $J = 8.7$, 2H, Ar), 7.59 (d, $J = 8.7$, 2H, Ar), 7.71 (d, $J = 8.7$, 2H, Ar), 10.20 (s a, 1H, NH).

3.1.31. (+)-3-Oxo-3-({4-[4-(biotinilamino)benzoi]fenil}amino)propanoato de etilo, **78**

Obtenido a partir de la amina **77** (0.62 mmol) y ácido 3-etoxi-3-oxopropanoico (1.8 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.13, método C. Cromatografía: diclorometano/etanol 95:5. Rto: 90%. P.f. 136-138 °C. $[\alpha]_D^{20}$: +47.9 ($c = 0.70$, DMSO).

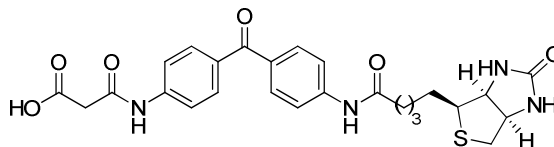


Rf (diclorometano/etanol 9:1): 0.2. IR (ATR, cm^{-1}): 3261 (NH), 1695 (CO), 1595, 1529, 1463 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ): 1.21 (t, $J = 7.1$, 3H, CH_3), 1.35-1.65 (m, 6H,

(CH₂)₃), 2.37 (t, $J = 7.3$, CH₂CO), 2.58 (d, $J = 12.4$, 1H, 1/2CH₂S), 2.83 (dd, $J = 12.4$, 5.1, 1H, 1/2CH₂S), 3.10-3.16 (m, 1H, CHS), 3.51 (s, 2H, CH₂(CO)₂), 4.10-4.17 (m, 3H, CH₂O, CHNH), 4.29-4.34 (m, 1H, CHNH), 6.35 (s a, 1H, NH), 6.43 (s a, 1H, NH), 7.67-7.78 (m, 8H, Ar), 10.24 (s a, 1H, NH), 10.53 (s a, 1H, NH). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 14.0 (CH₃), 25.0, 28.1, 28.2 ((CH₂)₃), 36.3 (CH₂CO), 40.1 (CH₂S), 43.8 (CH₂(CO)₂), 55.4 (CHS), 59.2 (CHNH), 60.7 (CH₂O), 61.0 (CHNH), 118.2 (2CH_{Ar}), 118.3 (2CH_{Ar}), 130.9 (4CH_{Ar}), 131.6, 132.3, 142.4, 143.2 (4C_{Ar}), 162.7 (NHCONH), 164.6, 167.5, 171.8 (2CONH, COO), 193.4 (CO).

3.1.32. Síntesis de ácido (+)-3-oxo-3-({4-[4-(biotinilamino)benzoil]-fenil}amino)propa-noico, **75**

Una suspensión del éster **78** (315 mg, 0.57 mmol) en 2.0 mL de una disolución de NaOH (1 M en metanol) se agita durante 2 h a temperatura ambiente. Se evapora el disolvente a presión reducida y el residuo se acidifica con una disolución acuosa de HCl 1 M. El precipitado obtenido se filtra, se lava con agua y se seca en condiciones de alto vacío a 35 °C durante toda la noche, para obtener **75** (177 mg, 60%). P.f. 182-186 °C. $[\alpha]_D^{20}$: +106.2 ($c = 0.30$, diclorometano/metanol, 1:1).

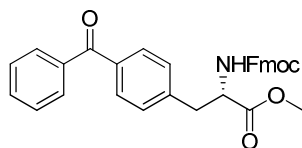


Rf (acetato de etilo/metanol/ácido acético 8:2:0.1): 0.2. IR (ATR, cm⁻¹): 3300 (NH, OH), 1695, 1672 (CO), 1596, 1530, 1471 (Ar). ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 1.36-1.65 (m, 6H, (CH₂)₃), 2.37 (t, $J = 7.2$, CH₂CO), 2.57 (d, $J = 12.4$, 1H, 1/2CH₂S), 2.82 (dd, $J = 12.4$, 5.0, 1H, 1/2CH₂S), 3.09-3.16 (m, 1H, CHS), 3.40 (s, 2H, CH₂(CO)₂), 4.12-4.16 (m, 1H, CHNH), 4.29-4.33 (m, 1H, CHNH), 6.41 (s a, 1H, NH), 6.50 (s a, 1H, NH), 7.71-7.80 (m, 8H, Ar), 10.30 (s a, 1H, NH), 10.61 (s a, 1H, NH). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 25.9, 29.0, 29.1 ((CH₂)₃), 37.2 (CH₂CO), 40.7 (CH₂S), 45.0 (CH₂(CO)₂), 56.2 (CHS), 60.1, 61.9 (2CHNH), 119.1 (4CH_{Ar}), 131.8 (4CH_{Ar}), 132.5, 133.0, 143.5, 144.0 (4C_{Ar}), 163.6 (NHCONH), 166.1, 170.0, 172.7 (2CONH, COO), 194.2 (CO).

3.1.33. Síntesis de (+)-4-benzoil-*N*-[(9*H*-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-*L*-fenilalaninato de metilo, **79**

Una suspensión de 4-benzoil-*N*-[(9*H*-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-*L*-fenilalanina (230 mg, 0.47 mmol) y K₂CO₃ (77 mg, 0.55 mmol) en DMF anhidra (4.6 mL) se agita a temperatura ambiente durante 30 min. Se añade yoduro de metilo (86 μ L, 1.4 mmol) a 0 °C y se agita a temperatura ambiente durante 90 min. Se diluye con agua (50 mL), se extrae con éter etílico, la fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El

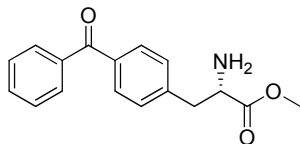
residuo se purifica por cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 1:1) para obtener **79** (213 mg, 90%). P.f. 58-62 °C. $[\alpha]_D^{20}$: +43.0 (c = 1.0, cloroformo).



Rf (hexano/acetato de etilo 7:3): 0.3. IR (ATR, cm^{-1}): 1723, 1656 (CO), 1605, 1526, 1445 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 3.22 (sistema AB, $J = 13.8, 5.8$, 2H, CH_2Ar), 3.77 (s, 3H, CH_3), 4.22 (t, $J = 6.7$, 1H, CH_{Fmoc}), 4.40 (dd, $J = 10.5, 6.8$, 1H, $1/2\text{CH}_2\text{Fmoc}$), 4.52 (dd, $J = 10.6, 7.0$, 1H, $1/2\text{CH}_2\text{Fmoc}$), 4.71-4.78 (m, 1H, CHNH), 5.36 (d, $J = 8.1$, 1H, NH), 7.21 (d, $J = 7.9$, 2H, Fmoc), 7.32 (t, $J = 7.4$, 2H, benzf), 7.41 (t, $J = 7.5$, 2H, benzf), 7.48 (t, $J = 7.5$, 2H, Fmoc), 7.57-7.63 (m, 3H, benzf, Fmoc), 7.74-7.80 (m, 6H, benzf, Fmoc). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 38.6 (CH_2), 47.6 (CH_{Fmoc}), 52.9 (CH_3), 55.0 (CHNH), 67.3 (CH_2), 120.4 (2CH_{Fmoc}), 125.4, 125.5 (2CH_{Fmoc}), 127.5 (2CH_{Fmoc}), 128.2 ($2\text{CH}_{\text{benzf}}$), 128.7, 129.7 ($2\text{CH}_{\text{benzf}}, 2\text{CH}_{\text{Fmoc}}$), 130.4 ($2\text{CH}_{\text{benzf}}$), 130.8 ($2\text{CH}_{\text{benzf}}$), 132.8 (CH_{benzf}), 136.8 (2C_{benzf}), 138.0, 141.2, 141.8, 144.1, 144.2 ($\text{C}_{\text{benzf}}, 4\text{C}_{\text{Fmoc}}$), 155.9 (NHCO), 172.0 (CO_2), 196.7 (CO). HPLC (Gradiente-I, t_R , min): 25.1. MS (ESI): 284.1 $[\text{M}-\text{Fmoc}]^+$, 506.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 528.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3.1.34. (+)-4-Benzoil-L-fenilalaninato de metilo, **80**⁹⁰

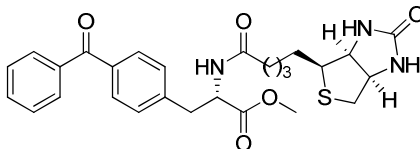
Obtenido a partir de la *N*-Fmoc amina **79** (0.65 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.15. Cromatografía: acetato de etilo. Rto: 77%. Aceite. $[\alpha]_D^{20}$: +6.9 (c = 1.0, cloroformo).



Rf (acetato de etilo): 0.2. IR (ATR, cm^{-1}): 1740, 1656 (CO), 1604, 1501 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.56 (s, 2H, NH_2), 2.95 (dd, $J = 13.5, 7.9$, 1H, $1/2\text{CH}_2$), 3.18 (dd, $J = 13.5, 5.2$, 1H, $1/2\text{CH}_2$), 3.74 (s, 3H, CH_3), 3.79 (dd, $J = 7.9, 5.2$, 1H, CHNH_2), 7.32 (d, $J = 8.2$, 2H, Ar), 7.45-7.50 (m, 2H, Ar), 7.59 (t, $J = 7.5$, 1H, Ar), 7.75-7.81 (m, 4H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 41.1 (CH_2), 52.2 (CH_3), 55.7 (CH), 128.4 (2CH_{Ar}), 129.3 (2CH_{Ar}), 130.1 (2CH_{Ar}), 130.5 (2CH_{Ar}), 132.5 (CH_{Ar}), 136.3, 137.7, 142.5 (3C_{Ar}), 175.3 (COO), 196.4 (CO). HPLC (Gradiente-I, t_R , min): 16.1. MS (ESI): 284.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 306.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3.1.35. (+)-4-Benzoil-*N*-biotinil-L-fenilalaninato de metilo, **81⁹⁶**

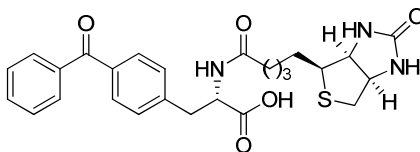
Obtenido a partir de la amina **80** (1.0 mmol) y biotina (1.7 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.13, método C. Cromatografía: diclorometano/acetato de etilo 95:5. Rto: 63%. P.f. 85-96 °C. $[\alpha]_D^{20}$: +63.6 (c = 0.59, cloroformo).



Rf (diclorometano/etanol 95:5): 0.2. IR (ATR, cm^{-1}): 3272 (NH), 1738, 1698, 1656 (CO), 1606, 1539, 1448 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.31-1.40 (m, 2H, CH_2), 1.54-1.72 (m, 4H, 2CH_2), 2.18 (t, $J = 7.2$, 2H, CH_2CO), 2.26 (d, $J = 12.8$, 1H, $1/2\text{CH}_2\text{S}$), 2.81 (dd, $J = 12.8$, 4.9, 1H, $1/2\text{CH}_2\text{S}$), 3.04-3.15 (m, 2H, CHS, $1/2\text{CH}_2\text{Ar}$), 3.24 (dd, $J = 13.9$, 5.5, 1H, $1/2\text{CH}_2\text{Ar}$), 3.72 (s, 3H, CH_3), 4.26 (dd, $J = 7.6$, 4.7, 1H, $\text{CHNH}_{\text{biotina}}$), 4.47 (dd, $J = 7.6$, 4.9, 1H, $\text{CHNH}_{\text{biotina}}$), 4.85-4.92 (m, 1H, CHNH), 6.00 (s a, 1H, NH), 6.77 (s a, 1H, NH), 7.23 (d, $J = 7.9$, 1H, NH), 7.28 (d, $J = 8.2$, 2H, Ar), 7.46 (t, $J = 7.4$, 2H, Ar), 7.59 (t, $J = 7.5$, 1H, Ar), 7.73-7.77 (m, 4H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 25.5, 28.1, 28.5 ($(\text{CH}_2)_3$), 35.7 (CH_2CO), 37.7 (CH_2Ar), 40.6 (CH_2S), 52.6 (CH_3), 53.1, 56.0 (CHNH , CHS), 60.3, 62.0 ($2\text{CHNH}_{\text{biot}}$), 128.4 (2CH_{Ar}), 129.3 (2CH_{Ar}), 130.1 (2CH_{Ar}), 130.5 (2CH_{Ar}), 132.6 (CH_{Ar}), 136.3, 137.6, 141.6 (3C_{Ar}), 164.5 (NHCONH), 173.1, 173.5 (CONH , COO), 196.5 (CO). HPLC (Gradiente-IV, t_R , min): 31.8. MS (ESI): 509.6 $[\text{M}]^+$, 510.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.1.36. Síntesis de (+)-4-benzoil-*N*-biotinil-L-fenilalanina, **76⁹⁶**

Sobre una disolución del éster metílico **81** (320 mg, 0.63 mmol) en THF (1.6 mL), se añade una disolución de $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (55 mg, 1.3 mmol) en agua (1.6 mL) y la mezcla de reacción se agita 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se evapora el THF a presión reducida, se acidifica con una disolución acuosa de HCl 1 M y el precipitado resultante se filtra, se lava con agua y se seca en condiciones de alto vacío a 35 °C durante toda la noche, para obtener **76** (246 mg, 80%). P.f. 129-133 °C. $[\alpha]_D^{20}$: +61.3 (c = 0.69, diclorometano/metanol 1:1).



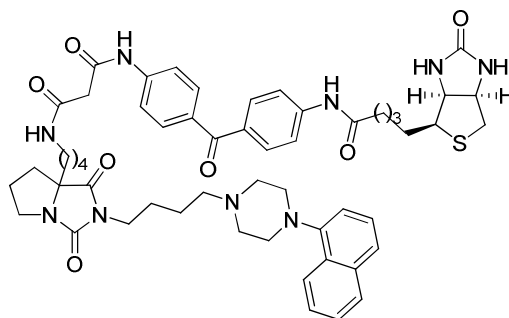
Rf (diclorometano/etanol 1:1): 0.3. IR (ATR, cm^{-1}): 3420 (NH, OH), 1696, 1651 (CO), 1540, 1453 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ): 1.14-1.22 (m, 2H, CH_2), 1.37-1.61 (m, 4H, 2CH_2), 2.06 (t, $J = 7.2$, 2H, CH_2CO), 2.49-2.55 (m, 1H, $1/2\text{CH}_2\text{S}$), 2.73 (dd, $J = 12.4$, 5.0, 1H, $1/2\text{CH}_2\text{S}$).

1/2CH₂S), 2.91-3.02 (m, 2H, CHS, 1/2CH₂Ar), 3.18 (dd, $J = 13.7, 4.5$, 1H, 1/2CH₂Ar), 4.03-4.07 (m, 1H, CHNH_{biotina}), 4.22-4.26 (m, 1H, CHNH_{biotina}), 4.47-4.55 (m, 1H, CHNH), 6.35 (s a, 1H, NH), 6.39 (s a, 1H, NH), 7.42 (d, $J = 8.2$, 2H, Ar), 7.56 (t, $J = 7.3$, 2H, Ar), 7.65-7.72 (m, 5H, Ar), 8.21 (d, $J = 8.3$, 1H, NH), 12.77 (COOH). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 25.1 (CH₂), 27.9 (2CH₂), 34.8 (CH₂CO), 36.7 (CH₂Ar), 39.8 (CH₂S), 52.9, 55.4 (CHNH, CHS), 59.1, 61.0 (2CHNH_{biotina}), 128.5 (2CH_{Ar}), 129.3 (2CH_{Ar}), 129.5 (2CH_{Ar}), 129.6 (2CH_{Ar}), 132.6 (CH_{Ar}), 135.1, 137.2, 143.1 (3C_{Ar}), 162.6 (NHCONH), 172.1, 172.9 (CONH, COO), 195.4 (CO). HPLC (Gradiente-III, t_R , min): 20.8 MS (ESI): 494.0 [M-H]⁻.

3.1.37. Compuestos marcados con benzofenona y biotina 62-65

3.1.37.1. (+)-*N*-{4-[2-[4-[4-(1-Naftil)piperazin-1-il]butil]-1,3-dioxotetrahidro-1*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-7a(5*H*)-il]butil}-*N'*-{4-[4-(biotinilamino)benzoil]fenil}malonamida, 62

Obtenido a partir de la amina **38** (0.14 mmol) y el ácido **75** (0.16 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.13, método C. Cromatografía: diclorometano/etanol/amoniaco 9:1:0.1. Rto: 8%. P.f. 171-172 °C. $[\alpha]_D^{20}$: +12.6 ($c = 0.55$, diclorometano/metanol 1:1).

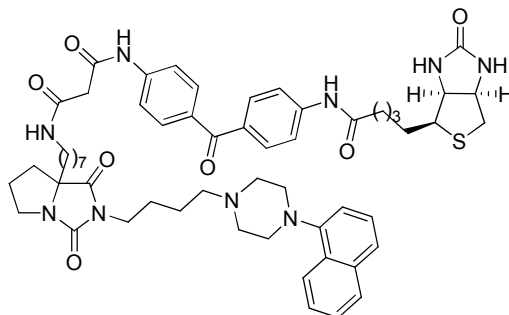


R_f (diclorometano/etanol 8:2): 0.5. IR (ATR, cm⁻¹): 3305 (NH), 1766, 1699, 1593 (CONCON, CONH, CO), 1528, 1450 (Ar). ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 1.40-1.70 (m, 15H, 7CH₂, 1/2CH₂cic), 1.74-1.82 (m, 3H, CH₂, 1/2CH₂cic), 1.90-2.05 (m, 2H, CH₂cic), 2.34-2.42 (m, 4H, CH₂CO, CH₂N_{pip}), 2.56-2.60 (m, 5H, 2CH₂pip, 1/2CH₂S), 2.83 (dd, $J = 12.4, 5.1$, 1H, 1/2CH₂S), 3.01-3.16 (m, 8H, 2CH₂pipNAr, CH₂NH, CHS, 1/2CH₂cicN), 3.27 (s, 2H, CH₂(CO)₂), 3.36-3.42 (m, 2H, CH₂N(CO)₂), 3.54-3.63 (m, 1H, 1/2CH₂cicN), 4.12-4.16 (m, 1H, CHNH), 4.29-4.33 (m, 1H, CHNH) 6.34 (s a, 1H, NH), 6.41 (s a, 1H, NH), 7.09 (d, $J = 7.3$, 1H, naft), 7.40 (t, $J = 7.8$, 1H, naft), 7.46-7.50 (m, 2H, naft), 7.56 (d, $J = 8.1$, 1H, naft), 7.68-7.77 (m, 8H, benzf), 7.84-7.87 (m, 1H, naft), 8.04-8.10 (m, 2H, naft, NH), 10.22 (s, 1H, NH), 10.43 (s, 1H, NH). ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 23.4, 25.0, 25.4, 25.5, 26.2, 28.1, 28.2, 28.9, 32.3, 34.0 (2(CH₂)₃, (CH₂)₂, 2CH₂cic), 36.3 (CH₂CO), 38.1, 38.5, 39.9, 44.6 (CH₂N(CO)₂, CH₂NH, CH₂S), 44.8 (CH₂(CO)₂, CH₂cicN), 52.6 (2CH₂pipNAr), 53.1 (2CH₂pip), 55.3 (CHS), 57.2 (CH₂N_{pip}), 59.2, 61.3 (2CHNH), 71.8 (C_{cic}), 114.5 (CH_{naft}), 118.2 (2CH_{benzf}), 118.3 (2CH_{benzf}), 123.0, 123.3, 125.3, 125.8, 126.0 (5CH_{naft}), 128.1 (C_{naft}), 128.2 (CH_{naft}), 130.9 (4CH_{benzf}), 131.6, 132.0 (2C_{benzf}), 134.3 (C_{naft}),

142.6, 143.1 ($2C_{\text{benzf}}$), 149.3 (C_{naft}), 160.1 (NCON), 162.7 (NHCONH), 166.1, 166.3, 171.8 ($3CONH$), 175.9 (CON), 193.3 (CO). HPLC (Gradiente-II, t_R , min): 16.9. MS (ESI): 492.5 $[(M+2H)/2]^+$, 984.5 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{54}H_{65}N_9O_7S \cdot 4HCl \cdot H_2O$) C, H, N, S.

3.1.37.2. (+)-*N*-{7-[2-{4-[4-(1-Naftil)piperazin-1-il]butil}-1,3-dioxotetrahidro-1*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-7a(5*H*)-il]heptil}-*N'*-{4-[4-(biotinilamino)benzoil]fenil}malonamida, 63

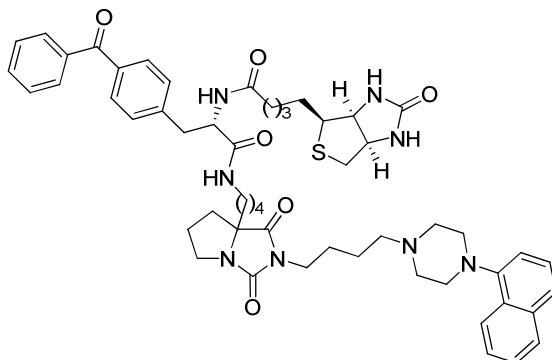
Obtenido a partir de la amina **39** (0.10 mmol) y el ácido **75** (0.15 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.13, método C. Cromatografía: diclorometano/etanol/amoniaco 9:1:0.1. Rto: 36%. P.f. 98-100 °C. $[\alpha]_D^{20}$: +16.3 ($c = 0.55$, diclorometano/metanol 1:1).



Rf (diclorometano/etanol 8:2): 0.3. IR (ATR, cm^{-1}): 3279 (NH), 1765, 1698 (CONCON, CON, CO), 1593, 1528, 1450 (Ar). 1H -RMN (500 MHz, $DMSO-d_6$, δ): 0.81-0.85 (m, 1H, $1/2CH_{2cic}$), 1.24-1.80 (m, 23H, $11CH_2$, $1/2CH_{2cic}$), 1.91-2.08 (m, 2H, CH_{2cic}), 2.35-2.38 (m, 4H, CH_2CO , CH_2N_{pip}), 2.57-2.63 (m, 5H, $2CH_{2pip}$, $1/2CH_2S$), 2.82 (dd, $J = 12.4, 5.2$, 1H, $1/2CH_2S$), 3.01-3.07 (m, 6H, $2CH_{2pip}NAr$, CHS, $1/2CH_{2cic}N$), 3.11-3.15 (m, 2H, CH_2NH), 3.29 (s, 2H, $CH_2(CO)_2$), 3.36-3.43 (m, 2H, $CH_2N(CO)_2$), 3.51-3.60 (m, 1H, $1/2CH_{2cic}N$), 4.13-4.15 (m, 1H, $CHNH$), 4.29-4.32 (m, 1H, $CHNH$), 6.35 (s a, 1H, NH), 6.43 (s a, 1H, NH), 7.10 (d, $J = 7.3$, 1H, naft), 7.41 (t, $J = 7.8$, 1H, naft), 7.46-7.51 (m, 2H, naft), 7.57 (d, $J = 8.1$, 1H, naft), 7.69 (dd, $J = 8.7, 3.3$, 4H, benzf), 7.75 (t ap, $J = 8.1$, 4H, benzf), 7.85-7.87 (m, 1H, naft), 8.03-8.05 (m, 1H, NH), 8.08-8.09 (m, 1H, naft), 10.24 (s, 1H, NH), 10.44 (s, 1H, NH). ^{13}C -RMN (125 MHz, $DMSO-d_6$, δ): 23.4, 23.5, 25.0, 25.4, 25.5, 26.2, 28.1, 28.2, 28.6, 28.8, 28.9, 32.4, 34.3 ($(CH_2)_3$, $(CH_2)_6$, $(CH_2)_2$, $2CH_{2cic}$), 36.3 (CH_2CO), 38.0, 38.7, 39.8 ($CH_2N(CO)_2$, CH_2NH , CH_2S), 44.6, 44.8 ($CH_2(CO)_2$, $CH_{2cic}N$), 52.6 ($2CH_{2pip}NAr$), 53.1 ($2CH_{2pip}$), 55.3 (CHS), 57.2 (CH_2N_{pip}), 59.2, 61.0 ($2CHNH$), 71.9 (C_{cic}), 114.5 (CH_{naft}), 118.2 ($2CH_{benzf}$), 118.3 ($2CH_{benzf}$), 123.0, 123.2, 125.3, 125.8, 126.0 ($5CH_{naft}$), 128.1 (C_{naft}), 128.3 (CH_{naft}), 130.9 ($4CH_{benzf}$), 131.6, 132.0 ($2C_{benzf}$), 134.3 (C_{naft}), 142.6, 143.1 ($2C_{benzf}$), 149.3 (C_{naft}), 160.1 (NCON), 162.7 (NHCONH), 166.0, 166.3, 171.8 ($3CONH$), 175.9 (CON), 193.3 (CO). HPLC (Gradiente-II, t_R , min): 18.3. MS (ESI): 513.3 $[(M+2H)/2]^+$, 1025.4 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{57}H_{71}N_9O_7S \cdot 4HCl \cdot 7H_2O$) C, H, N, S.

3.1.37.3. (+)-4-Benzoil-*N*-{4-[2-{4-[4-(1-naftil)piperazin-1-il]butil}-1,3-dioxotetrahidro-1*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-7*a*(5*H*)-il]butil}-*N*-biotinil}-*L*-fenilalaninamida, 64

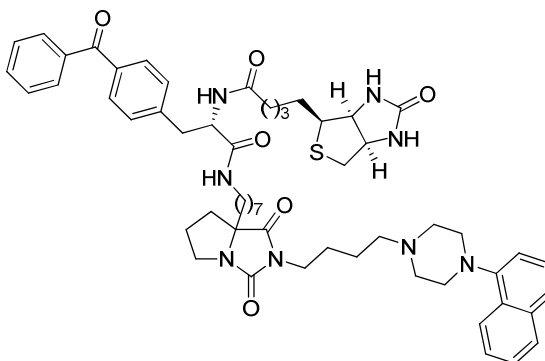
Obtenido a partir de la amina **38** (0.14 mmol) y el ácido **76** (0.20 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.13, método C. Cromatografía: diclorometano/etanol/amoniaco 9:1:0.1. Rto: 20%. P.f. 90-92 °C. $[\alpha]_D^{20}$: +14.5 ($c = 0.75$, diclorometano/metanol 1:1).



R_f (diclorometano/etanol/amoniaco 9:1:0.1): 0.2. IR (ATR, cm⁻¹): 3268 (NH), 1767, 1702, 1653 (CONCON, CON), 1603, 1550, 1447 (Ar). ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 1.08-1.80 (m, 18H, 8CH₂, CH_{2cic}), 1.91-2.06 (m, 4H, CH_{2cic}, CH₂CO), 2.36 (t, $J = 6.5$, 2H, CH₂N_{pip}), 2.53-2.59 (m, 5H, 2CH_{2pip}, 1/2CH₂S), 2.70 (dd, $J = 12.5$, 5.1, 1H, 1/2CH₂S), 2.78-3.03 (m, 9H, 2CH_{2pip}NAr, CH₂Ar, CH₂NH, CHS), 3.13 (ddd, $J = 11.6$, 8.4, 5.7, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 3.36-3.40 (m, 2H, CH₂N(CO)₂), 3.52-3.61 (m, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 4.00-4.06 (m, 1H, CHNH_{biotina}), 4.20-4.24 (m, 1H, CHNH_{biotina}), 4.49-4.55 (m, 1H, CHNH), 6.34 (s a, 1H, NH), 6.38 (s a, 1H, NH), 7.08 (d, $J = 6.8$, 1H, naft), 7.37-7.42 (m, 3H, naft, benzf), 7.46-7.58 (m, 5H, naft, benzf), 7.62-7.69 (m, 5H, benzf), 7.84-7.87 (m, 1H, naft), 8.00-8.09 (m, 3H, naft, 2NH). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 20.9, 23.4, 25.1, 25.4, 25.6, 27.9, 28.1, 28.9, 30.7, 32.3 (2(CH₂)₃, (CH₂)₂, 2CH_{2cic}), 34.9, 35.0 (CH₂CO, CH₂Ar), 38.1, 38.2, 39.6 (CH₂N(CO)₂, CH₂NH, CH₂S), 44.6 (CH_{2cic}N), 52.6 (2CH_{2pip}NAr), 53.1 (2CH_{2pip}), 53.5 (CHNH), 55.4 (CHS), 57.2 (CH₂N_{pip}), 59.1, 61.0 (2CHNH_{biot}), 71.9 (C_{cic}), 114.5, 123.0, 123.3, 125.4, 125.8, 126.0 (6CH_{naft}), 128.1 (C_{naft}), 128.3 (CH_{naft}), 128.5 (2CH_{benzf}), 129.4 (2CH_{benzf}), 129.5 (2CH_{benzf}), 129.6 (2CH_{benzf}), 132.6 (CH_{benzf}), 134.3 (C_{naft}), 135.0, 137.2, 143.5 (3C_{benzf}), 149.3 (C_{naft}), 160.1 (NCON), 162.7 (NHCONH), 170.8, 171.9 (2CONH), 175.9 (CON), 195.5 (CO). HPLC (Gradiente-I, t_R, min): 21.6. MS (ESI): 478.4 [(M+2H)/2]⁺, 955.5 [M+H]⁺. Anal. (C₅₄H₆₆N₈O₆S·3HCl·H₂O) C, H, N, S.

3.1.37.4. (+)-4-Benzoil-*N*-{7-[2-{4-[4-(1-naftil)piperazin-1-il]butil}-1,3-dioxotetrahidro-1*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-7*a*(5*H*)-il]heptil}-*N*-biotinil}-*L*-fenilalaninamida, 65

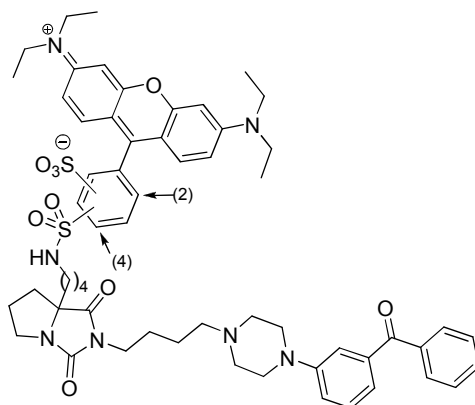
Obtenido a partir de la amina **39** (0.11 mmol) y el ácido **76** (0.17 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.13, método C. Cromatografía: diclorometano/etanol/amoniaco 9:1:0.1. Rto: 46%. P.f. 100-105 °C. $[\alpha]_D^{20}$: +18.7 ($c = 0.60$, diclorometano/metanol 1:1).



R_f (diclorometano/etanol/amoniaco 9:1:0.1): 0.2. IR (ATR, cm⁻¹): 3270 (NH), 1766, 1702, 1653 (CONCON, CON), 1604, 1547, 1446 (Ar). ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 1.00-1.30 (m, 12H, 6CH₂), 1.33-1.42 (m, 5H, 2CH₂, 1/2CH_{2cic}), 1.52-1.61 (m, 4H, 2CH₂), 1.67-1.85 (m, 3H, CH₂, 1/2CH_{2cic}), 1.91-2.10 (m, 4H, CH₂CO, CH_{2cic}), 2.38 (t, $J = 6.9$, 2H, CH₂N_{pip}), 2.55-2.60 (m, 5H, 2CH_{2pip}, 1/2CH_{2S}), 2.73 (dd, $J = 12.3, 4.9$, 1H, 1/2CH_{2S}), 2.80-3.16 (m, 10H, 2CH_{2pip}NAr, CH₂Ar, CH₂NH, 1/2CH_{2cic}N, CHS), 3.39-3.48 (m, 2H, CH₂N(CO)₂), 3.53-3.62 (m, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 4.02-4.07 (m, 1H, CHNH_{biotina}), 4.21-4.27 (m, 1H, CHNH_{biotina}), 4.49-4.57 (m, 1H, CHNH), 6.34 (s a, 1H, NH), 6.39 (s a, 1H, NH), 7.09 (d, $J = 6.9$, 1H, naft), 7.38 (d, $J = 8.2$, 2H, benzf), 7.41 (t, $J = 7.9$, 1H, naft), 7.45-7.51 (m, 2H, naft), 7.53-7.58 (m, 3H, naft, benzf), 7.62-7.70 (m, 5H, benzf), 7.85-7.88 (m, 1H, naft), 7.95 (m, 1H, NH), 8.07-8.10 (m, 2H, naft, NH). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 23.4, 23.6, 25.1, 25.2, 25.4, 25.6, 26.3, 27.9, 28.0, 28.7, 28.9, 29.0, 32.4 ((CH₂)₆, (CH₂)₃, (CH₂)₂, 2CH_{2cic}), 34.3, 34.9 (CH₂CO, CH₂Ar), 38.1, 38.4, 39.6 (CH₂N(CO)₂, CH₂NH, CH₂S), 44.6 (CH_{2cic}N), 52.7 (2CH_{2pip}NAr), 53.1 (2CH_{2pip}), 53.5 (CHNH), 55.4 (CHS), 57.3 (CH₂N_{pip}), 59.2, 61.0 (2CHNH_{biot}), 71.9 (C_{cic}), 114.5, 123.0, 123.3, 125.4, 125.8, 126.0 (6CH_{naft}), 128.1 (C_{naft}), 128.3 (CH_{naft}), 128.6 (2CH_{benzf}), 129.4 (2CH_{benzf}), 129.5 (2CH_{benzf}), 129.6 (2CH_{benzf}), 132.6 (CH_{benzf}), 134.3 (C_{naft}), 135.0, 137.2, 143.4 (3C_{benzf}), 149.3 (C_{naft}), 160.1 (NCON), 162.7 (NHCONH), 170.6, 171.9 (2CONH), 175.9 (CON), 195.4 (CO). HPLC (Gradiente-I, t_R, min): 22.1. MS (ESI): 499.5 [(M+2H)/2]⁺, 997.5 [M+H]⁺. Anal. (C₅₇H₇₂N₈O₆S·3HCl) C, H, N, S.

3.1.38. *N*-{4-[2-{4-[4-(3-Benzoilfenil)piperazin-1-il]butil}-1,3-dioxotetrahidro-1*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-7*a*(5*H*)-il]butil}-lisaminamida, 82

Obtenido a partir de la amina **86** (0.11 mmol) y cloruro de lisamina (0.11 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.12. Cromatografía: diclorometano/etanol 95:5. Rto: 40%. P.f. 178-182 °C.

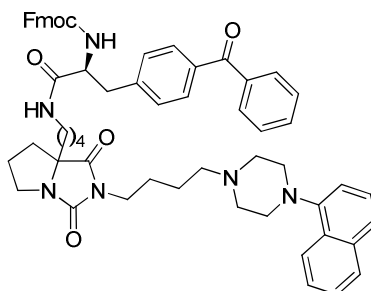


R_f (diclorometano/etanol 95:5): 0.1. IR (ATR, cm⁻¹): 1766, 1705 (CONCON), 1651 (CO), 1591, 1486, 1459, 1445 (Ar). ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 1.20 (t, *J* = 7.2, 12H, 4CH₃), 1.36-1.71 (m, 9H, 4CH₂, 1/2CH_{2cic}), 1.71-1.81 (m, 2H, CH₂), 1.88-2.10 (m, 3H, 3/2CH_{2cic}), 2.26-2.35 (m, 2H, CH_{2Npip}), 2.45 (m, 4H, 2CH_{2pip}), 2.80-2.87 (m, 2H, CH_{2NH}), 3.14-3.17 (m, 5H, 2CH_{2pip}NAr, 1/2CH_{2cic}N), 3.39 (m, 2H, CH_{2N(CO)₂}), 3.55-3.67 (m, 9H, 4CH₂CH₃, 1/2CH_{2cic}N), 6.91-7.05 (m, 6H, benzf, lis), 7.20-7.23 (m, 2H, benzf, lis), 7.32 (d, *J* = 7.7, 1H, benzf), 7.40 (d, *J* = 7.9, 1H, benzf), 7.51-7.58 (m, 2H, benzf), 7.63-7.74 (m, 3H, benzf, lis), 7.89-7.96 (m, 2H, benzf), 8.39 (d, *J* = 1.9, 1H, lis). ¹³C-RMN (175 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 12.4 (4CH₃), 20.7, 25.4, 25.6, 29.0, 32.3, 33.9, 38.0, 38.3 ((CH₂)₃, (CH₂)₂, 2CH_{2cic}, CH_{2N(CO)₂}), 42.4 (CH_{2NH}), 44.6 (CH_{2cic}N), 45.3 (4CH₂CH₃), 47.8 (2CH_{2pip}NAr), 52.5 (2CH_{2pip}), 54.9 (CH_{2Npip}), 71.8 (C_{cic}), 95.4 (2CH_{lis}), 113.4 (2C_{lis}), 113.6 (2CH_{lis}), 125.7, 126.5 (2CH_{lis}), 128.5 (4CH_{benzf}), 129.0 (CH_{benzf}), 129.6 (4CH_{benzf}), 130.6 (CH_{lis}), 132.6 (2CH_{lis}), 132.9 (C_{lis}), 137.2 (2C_{lis}), 137.8, 141.6, 148.0 (3C_{benzf}), 155.0 (2C_{lis}), 157.1 (2C_{lis}), 157.5 (C_{lis}), 160.0 (NCON), 175.9 (CON), 196.1 (CO). HRMS (ESI) calculado para C₅₈H₇₀N₇O₉S₂ ([M+H]⁺): 1072.4671, encontrado: 1072.4715. Anal. (C₅₈H₆₉N₇O₉S₂·4HCl·3H₂O) C, H, N, S.

3.1.39. (-)-4-Benzoil-*N*-[(9*H*-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-*N*-{4-[2-{4-[4-(1-naftil)piperazin-1-il]butil}-1,3-dioxotetrahidro-1*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-7*a*(5*H*)-il]butil}-L-fenilalaninamida, 87

Obtenido a partir de la amina **38** (0.51 mmol) y 4-benzoil-*N*-[(9*H*-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-fenilalanina (0.77 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.13,

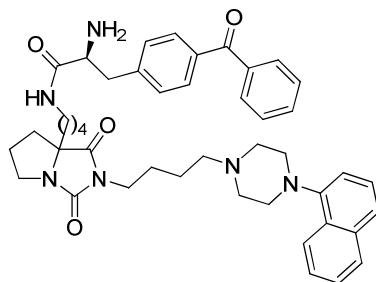
método C. Cromatografía: diclorometano/etanol/amoniaco 95:5:0.1. Rto: 80%. $[\alpha]_D^{20} = -5.5$ (c = 1.5, cloroformo)



Rf (diclorometano/etanol 95:5): 0.4. IR (ATR, cm^{-1}): 3305 (NH), 1767, 1706, 1663 (CONCON, CON, CO), 1604, 1535, 1447 (Ar). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.09-1.13 (m, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.38-1.67 (m, 8H, 4CH_2), 1.80-1.85 (m, 3H, CH_2 , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.97-2.09 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.45 (t, $J = 6.4$, 2H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 2.68 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 3.09-3.19 (m, 9H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$, CH_2Ar , CH_2NHCO , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.44-3.56 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.75 (dt, $J = 11.4$, 7.3, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 4.16 (t, $J = 6.7$, 1H, CH_{Fmoc}), 4.31-4.49 (m, 3H, CH_2Fmoc , CHNH), 5.65 (t, $J = 10.1$, 1H, NH), 6.19 (s a, 1H, NH), 7.04 (d, $J = 7.4$, 1H, Ar), 7.25-7.30 (m, 3H, Ar), 7.34-7.58 (m, 12H, Ar), 7.69-7.74 (m, 6H, Ar), 7.78-7.81 (m, 1H, Ar), 8.15-8.18 (m, 1H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ): 21.2, 24.1, 26.1, 26.2, 29.2, 33.1, 34.4 ($(\text{CH}_2)_3$, $(\text{CH}_2)_2$, $2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 38.6, 38.9, 39.2 (CH_2NHCO , $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$, CH_2Ar), 45.0 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 47.2 (CH_{Fmoc}), 53.0 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$), 53.8 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 56.1 (CHNH), 58.2 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 67.0 (CH_2Fmoc), 72.3 (C_{cic}), 114.7 (CH_{naft}), 120.1 (2CH_{Fmoc}), 123.5, 123.7 (2CH_{naft}), 125.0 (2CH_{Fmoc}), 125.4, 125.8, 125.9 (3CH_{naft}), 127.2 (2CH_{Fmoc}), 127.8 (2CH_{Fmoc}), 128.4 ($2\text{CH}_{\text{benzf}}$), 128.5 (CH_{naft}), 128.9 (C_{naft}), 129.4 ($2\text{CH}_{\text{benzf}}$), 130.0 ($2\text{CH}_{\text{benzf}}$), 130.5 ($2\text{CH}_{\text{benzf}}$), 132.5 (CH_{benzf}), 134.8 (C_{naft}), 136.3 (2C_{Ar}), 137.6, 141.4, 141.8, 143.7 (4C_{Ar}), 149.7 (C_{naft}), 156.0 (NHCO), 160.7 (NCON), 170.5 (CO), 176.3 (CON), 196.3 (CO_{benzf}). HPLC (Gradiente-I, t_R , min): 25.9. MS (ESI): 476.3 $[(M+2H)/2]^+$, 951.4 $[M+H]^+$.

3.1.40. (-)-4-Benzoil-N-{4-[2-{4-[4-(1-naftil)piperazin-1-il]butil}-1,3-dioxotetrahidro-1H-pirrolo[1,2-c]imidazol-7a(5H)-il]butil}-L-fenilalaninamida, 88

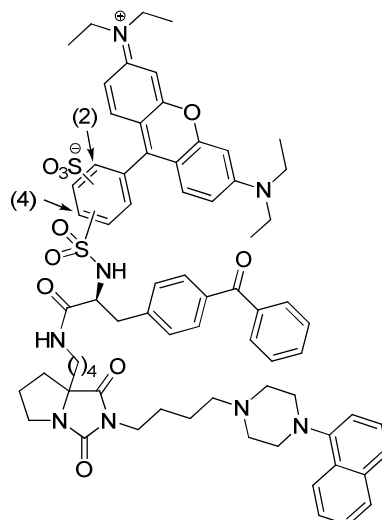
Obtenido a partir de la *N*-Fmoc amina **87** (0.40 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.15. Cromatografía: diclorometano/etanol/amoniaco 9:1:0.1. Rto: 75%. $[\alpha]_D^{20} = -19.6$ (c = 1.0, cloroformo).



R_f (diclorometano/etanol 9:1): 0.4. IR (ATR, cm⁻¹): 3372 (NH), 1767, 1706, 1659 (CONCON, CON, CO), 1603, 1520, 1447 (Ar). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.12-1.24 (m, 1H, 1/2CH_{2cic}), 1.31-1.71 (m, 10H, 4CH₂, NH₂), 1.81-1.95 (m, 3H, CH₂, 1/2CH_{2cic}), 1.98-2.10 (m, 2H, CH_{2cic}), 2.47 (t, *J* = 7.2, 2H, CH₂N_{pip}), 2.70-2.81 (m, 5H, 2CH_{2pip}, 1/2CH_{2cic}N), 3.11-3.35 (m, 8H, 2CH_{2pip}NAr, CH₂Ar, CH₂NHCO), 3.44-3.52 (m, 2H, CH₂N(CO)₂), 3.60 (dd, *J* = 9.2, 3.8, 1H, CHNH₂), 3.76 (dt, *J* = 10.6, 7.3, 1H, 1/2CH_{2cic}N), 7.06 (d, *J* = 7.3, 1H, naft), 7.27-7.59 (m, 9H, naft, benzf), 7.73-7.80 (m, 5H, naft, benzf), 8.15-8.18 (m, 1H, naft). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): 21.3, 24.2, 26.1, 26.3, 29.4, 33.2, 34.5 (2CH_{2cic}, (CH₂)₂, (CH₂)₃), 38.7, 39.0, 41.2 (CH₂NHCO, CH₂N(CO)₂, CH₂Ar), 45.0 (CH_{2cic}N), 53.1 (2CH_{2pip}NAr), 53.8 (2CH_{2pip}), 56.4 (CHNH), 58.2 (CH₂N_{pip}), 72.4 (C_{cic}), 114.7 (CH_{naft}), 123.5, 123.7 (2CH_{naft}), 125.4, 125.9, 126.0 (3CH_{naft}), 128.4 (2CH_{benzf}), 128.5 (CH_{naft}), 129.0 (C_{naft}), 129.4 (2CH_{benzf}), 130.1 (2CH_{benzf}), 130.7 (2CH_{benzf}), 132.6 (CH_{benzf}), 134.8 (C_{naft}), 136.3, 137.7, 143.3 (3C_{benzf}), 149.8 (C_{naft}), 160.8 (NCON), 173.9 (CO), 176.4 (CON), 196.4 (CO_{benzf}). HPLC (Gradiente-I, t_R, min): 19.9. MS (ESI): 365.2 [(M+2H)/2]⁺, 729.5 [M+H]⁺.

3.1.41. (-)-4-Benzoil-N-lisaminil-N-{4-[2-{4-[4-(1-naftil)piperazin-1-il]butil}-1,3-dioxo-tetrahydro-1H-pirrolol[1,2-c]imidazol-7a(5H)-il]butil}-L-fenilalaninamida, 83

Obtenido a partir de la amina **88** (0.14 mmol) y cloruro de lisamina (0.14 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.12. Cromatografía preparativa: diclorometano/etanol 9:1. Rto: 10%.



Rf (diclorometano/etanol 9:1): 0.1. ^1H -RMN (700 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ): 1.01-1.06 (m, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.19-1.22 (m, 12H, 4CH_3), 1.25-1.31 (m, 6H, 3CH_2), 1.53-1.60 (m, 2H, CH_2), 1.64-1.68 (m, 1H, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}$), 1.72-1.78 (m, 2H, CH_2), 1.90-1.99 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{cic}}$), 2.36 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 2.60 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 2.82-3.10 (m, 9H, $2\text{CH}_{2\text{pip}}\text{NAr}$, CH_2Ar , CH_2NHCO , $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 3.33-3.38 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$), 3.54-3.65 (m, 9H, $4\text{CH}_2\text{N}$, $1/2\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 4.07-4.11 (m, 1H, CHNH), 6.89-6.93 (m, 5H, Ar), 6.97 (d, $J = 9.4$, 1H, Ar), 7.09 (d, $J = 7.5$, 1H, Ar), 7.20 (t, $J = 7.8$, 1H, Ar), 7.38-7.40 (m, 3H, Ar), 7.46-7.50 (m, 4H, Ar), 7.56 (d, $J = 8.5$, 1H, Ar), 7.61-7.64 (m, 6H, Ar), 7.85 (d, $J = 6.5$, 1H, Ar), 7.98 (t, $J = 5.0$, 1H, NH), 8.08 (d, $J = 8.7$, 1H, Ar), 8.32-8.34 (m, 1H, NH), 8.39-8.40 (m, 1H, Ar). ^{13}C -RMN (175 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ): 12.1, 12.3 (4CH_3), 20.7, 25.0, 25.2, 28.5, 28.8, 32.0, 33.6 ($2\text{CH}_{2\text{cic}}$, $(\text{CH}_2)_2$, $(\text{CH}_2)_3$), 37.7, 37.8, 37.9, 38.3 (CH_2NHCO , $\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})_2$, CH_2Ar , $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}$), 44.2 ($\text{CH}_{2\text{cic}}\text{N}$), 45.0 ($4\text{CH}_2\text{N}$), 52.4 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 54.7 ($2\text{CH}_{2\text{pip}}$), 57.4 (CHNH), 71.8 (C_{cic}), 95.4 (2CH_{lis}), 113.3 ($2\text{CH}_{\text{benzf}}$), 114.5 (CH_{naft}), 123.1 (C_{lis}), 123.2 (2CH_{naft}), 125.4 (CH_{naft}), 125.9 (CH_{lis} , CH_{naft}), 126.0 (CH_{naft}), 126.3 (CH_{lis}), 128.0 (C_{naft}), 128.3 (CH_{naft}), 128.4 ($2\text{CH}_{\text{benzf}}$), 129.4 ($4\text{CH}_{\text{benzf}}$), 129.6 (2CH_{lis}), 130.0 (CH_{lis}), 132.6 (2CH_{lis}), 132.7 (CH_{benzf}), 134.3 (C_{naft}), 135.4, 136.9 (2C_{benzf}), 141.8 (C_{lis}), 142.5 (C_{benzf}), 147.4, 148.4 (2C_{lis}), 149.4 (C_{naft}), 151.2, 153.0, 154.9, 155.0, 157.0, 157.5 (6C_{lis}), 160.0 (NCON), 169.3 (CO), 175.8 (CON), 195.5 (CO_{benzf}). HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{71}\text{H}_{81}\text{N}_8\text{O}_{10}\text{S}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 1269.5512, encontrado: 1269.5512 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). Anal. ($\text{C}_{71}\text{H}_{80}\text{N}_8\text{O}_{10}\text{S}_2 \cdot 3\text{HCl}$) C, H, N, S.

3.1.42. (-)-4-Benzoil-N-5-hexinoil-N-{4-[2-{4-[4-(1-naftil)piperazin-1-il]butil}-1,3-dioxo-tetrahydro-1H-pirrolo[1,2-c]imidazol-7a(5H)-il]butil}-L-fenilalaninamida, 84

Obtenido a partir de la amina **88** (0.19 mmol) y ácido 5-hexinoico (0.29 mmol), siguiendo el procedimiento general 3.1.1.13, método B. Cromatografía: diclorometano/etanol 95:5. Rto: 53%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -1.2$ ($c = 1.0$, diclorometano)

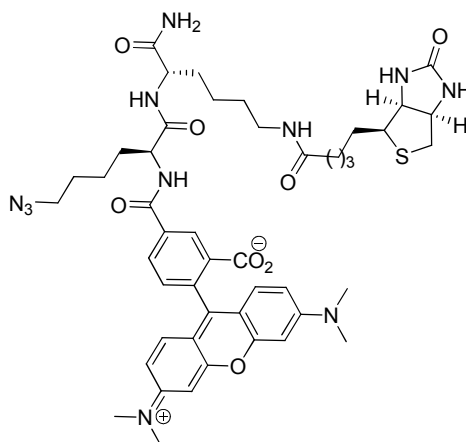
3.1.43. Síntesis de TriN_3

NC(=O)C[C@H](N)CCCC[N+]=[N-]

- 110 -

95:5), obteniéndose 0.62 g (Rto: 80%) de la amina **26** como un sólido amarillo. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.

3.1.43.2. Síntesis de TriN₃⁹⁵



La preparación de TriN₃ se lleva a cabo mediante síntesis manual en fase sólida. Se utiliza una resina Sieber Amida (Novabiochem) y los aminoácidos protegidos en el *N*-terminal en forma de Fmoc. Las reacciones de desprotección del grupo Fmoc se realizan en presencia de piperidina al 20% en *N*-metilpirrolidona (NMP, 2 x 2 mL, 8 min). Tras cada reacción se lava la resina (3 x NMP, 3 x DCM, 3 x NMP) para eliminar el exceso de reactivos. Las reacciones de acoplamiento se llevan a cabo durante 2.5 h a temperatura ambiente, usando 5 equiv del aminoácido en forma de Fmoc, hexafluorofosfato de *O*-(1*H*-benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HBTU, 5 equiv), HOBT (5 equiv) y diisopropiletilamina (DIPEA, 8 equiv) en NMP.

La resina protegida en forma de Fmoc (80 mg, 0.035 mmol, 1 equiv) se desprotege y se lava. A continuación, se acopla el aminoácido Fmoc-Lys(Biotin)-COOH (5 equiv). Se lava, se elimina el grupo Fmoc y se acopla el aminoácido Fmoc-Lys(N₃)-COOH (5 equiv). Tras los lavados adecuados y la eliminación del grupo Fmoc, se acopla rodamina al grupo amino libre del dipéptido, para ello se hace reaccionar el éster de *N*-hidroxisuccinimida de 5(6)-carboxitetrametilrodamina (1.35 equiv) en presencia de trietilamina (6 equiv) y NMP (1 mL). Se lava la resina y se desancla el péptido TriN₃ de la resina empleando una disolución de TFA al 2% en diclorometano (5 x 3 mL, 10 min). Se añade tolueno (20 mL) y se elimina el disolvente a presión reducida para obtener TriN₃ como un sólido oscuro (Rto: 90%).

3.2. Análisis elemental de los compuestos 1-22, 61-67, 82-84

	Fórmula molecular	Calculado				Encontrado			
		C	H	N	S	C	H	N	S
1	$C_{26}H_{34}N_4O_2 \cdot 2HCl$	61.53	7.15	11.04		61.62	7.18	10.57	
2	$C_{21}H_{30}N_4O_3 \cdot 2HCl$	54.89	7.02	12.19		54.78	7.18	12.10	
3	$C_{22}H_{27}N_3O_2 \cdot HCl \cdot H_2O$	62.92	7.20	10.01		63.40	7.09	9.61	
4	$C_{18}H_{25}N_3O_3 \cdot HCl$	58.77	7.12	11.42		58.79	7.04	11.16	
5	$C_{26}H_{35}N_5O_4S \cdot 2HCl \cdot H_2O$	51.65	6.50	11.58	5.30	51.68	6.72	11.76	5.02
6	$C_{26}H_{35}N_5O_4S \cdot HCl \cdot H_2O$	54.97	6.74	12.33	5.64	55.22	6.39	12.11	5.51
7	$C_{26}H_{35}N_5O_4S \cdot 2HCl \cdot 2H_2O$	50.16	6.64	11.25	5.15	50.44	6.29	11.10	5.26
8	$C_{26}H_{35}N_5O_4S \cdot 2HCl \cdot 2H_2O$	50.16	6.64	11.25	5.15	50.55	6.27	10.90	4.94
9	$C_{40}H_{50}N_6O_4S \cdot 3HCl \cdot 3H_2O$	56.10	6.71	9.81	3.74	56.22	6.77	9.55	3.60
10	$C_{43}H_{56}N_6O_5S \cdot 3HCl \cdot 3H_2O$	58.66	6.98	9.55	3.64	58.52	7.05	9.17	3.51
11	$C_{37}H_{50}N_6O_5S \cdot 3HCl \cdot 3H_2O$	52.02	6.96	9.84	3.75	51.98	6.61	9.51	3.54
12	$C_{40}H_{56}N_6O_5S \cdot 3HCl \cdot 3H_2O$	54.69	7.23	9.57	3.65	54.30	7.20	9.18	3.30
13	$C_{55}H_{67}N_7O_8S_2 \cdot 3HCl \cdot H_2O$	57.66	6.33	8.56	5.60	57.19	6.26	8.34	5.28
14	$C_{58}H_{73}N_7O_8S_2 \cdot 3HCl \cdot H_2O$	58.65	6.62	8.25	5.40	58.53	6.79	8.07	5.36
15	$C_{34}H_{40}N_8O_5 \cdot 2HCl \cdot 1/2H_2O$	56.51	6.00	15.51		56.57	6.26	15.80	
16	$C_{37}H_{46}N_8O_5 \cdot 2HCl$	58.80	6.40	14.83		58.73	6.55	14.39	
17	$C_{38}H_{53}N_7O_4S \cdot 2HCl \cdot 7/2H_2O$	54.34	7.44	11.67	3.82	54.12	7.15	11.43	3.82
18	$C_{41}H_{59}N_7O_4S \cdot 2HCl \cdot 7/2H_2O$	55.83	7.77	11.12	3.64	55.90	7.41	11.24	3.54
19	$C_{36}H_{50}N_6O_4S \cdot 2HCl \cdot 4H_2O$	53.52	7.49	10.40	3.97	53.98	6.89	9.85	4.30
20	$C_{32}H_{48}N_6O_5S \cdot HCl \cdot 5H_2O$	50.82	7.06	11.11	4.24	50.88	7.87	11.13	4.24
21	$C_{37}H_{51}N_5O_3 \cdot 2HCl \cdot 1/2H_2O$	63.87	7.82	10.07		64.05	7.98	10.18	
22	$C_{34}H_{51}N_5O_4 \cdot 2HCl \cdot H_2O$	59.64	8.10	10.23		59.95	7.61	10.11	
61	$C_{44}H_{61}N_7O_5S \cdot HCl \cdot 4H_2O$	58.16	7.77	10.79	3.53	58.52	8.21	10.66	3.46
62	$C_{54}H_{65}N_9O_7S \cdot 4HCl \cdot H_2O$	56.49	6.23	10.98	2.79	56.48	6.14	10.51	2.68
63	$C_{57}H_{71}N_9O_7S \cdot 4HCl \cdot 7H_2O$	52.73	6.91	9.71	2.47	52.83	6.65	9.51	2.39
64	$C_{54}H_{66}N_8O_6S \cdot 3HCl \cdot H_2O$	59.91	6.61	11.00	3.15	59.48	6.62	10.71	2.72

Fórmula molecular	Calculado				Encontrado			
	C	H	N	S	C	H	N	S
65 $C_{57}H_{72}N_8O_6S \cdot 3HCl$	61.86	6.83	10.13	2.90	61.44	6.90	9.83	2.98
66 $C_{27}H_{32}N_4O_3 \cdot HCl \cdot 5/2H_2O$	59.82	7.07	10.34		59.95	7.15	10.52	
67 $C_{27}H_{32}N_4O_3 \cdot HCl \cdot 2H_2O$	60.84	7.00	10.51		61.52	6.57	10.45	
82 $C_{58}H_{69}N_7O_9S_2 \cdot 4HCl \cdot 3H_2O$	54.76	6.26	7.71	5.04	54.96	6.40	7.39	4.84
83 $C_{71}H_{80}N_8O_{10}S_2 \cdot 3HCl$	61.84	6.70	8.13	4.65	62.07	6.28	8.17	4.18
84 $C_{50}H_{58}N_6O_5 \cdot HCl \cdot 3H_2O$	65.74	7.17	9.20		66.04	6.75	9.14	

3.3. Ensayos de desplazamiento de radioligando

Los experimentos de desplazamiento de radioligando se han llevado a cabo en placas de 96 pocillos (Optiplat), utilizando un contador 1450 MicroBeta Trilux (PerkinElmer), un aparato de filtración múltiple a vacío Filtermat® Harvester (PerkinElmer), láminas de líquido de centelleo MeltiLex A (PerkinElmer) y un pH-metro CRISON (micro pH 2001). Los radioligandos [3H]-OH-DPAT (170.2 Ci/mmol), [3H]ketanserina (60.0 Ci/mmol) y [3H]LSD (79.2 Ci/mmol) y las membranas de células transfectadas con el receptor adecuado -HEK-293-EBNA (5-HT_{1A}), CHO-K1 (5-HT_{2A} y 5-HT_{5A}) y HEK-293 (5-HT₆ y 5-HT₇)- se han adquirido en PerkinElmer.

Para todos los receptores, el ligando radioactivo unido se separa del libre por filtración a vacío sobre filtros Filtermat® A (Wallak) previamente equilibrados durante 30 min a 4 °C en una disolución de polietilenimina (0.5% para los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} y 5-HT₆ y 0.3% para el receptor 5-HT₇). El filtro se lava nueve veces con 0.5 mL de tampón Tris-HCl 50 mM frío (pH = 7.4 a 25 °C) y se seca. Por último, se deposita sobre el filtro una lámina de líquido de centelleo y, tras calentar 5 min a 80 °C y esperar a que vuelva a alcanzar la temperatura ambiente, se cuantifica la radioactividad unida a las membranas.

Todos los ensayos de inhibición competitiva se han realizado de dos a cuatro veces de forma independiente por triplicado. El valor de CI_{50} se ha determinado mediante regresión no lineal de la curva de desplazamiento (curva sigmoidal dosis-respuesta), obtenida con el programa Prism (GraphPad). La conversión de CI_{50} a K_i se ha llevado a cabo con la ecuación $K_i = CI_{50}/(1 + L/K_D)$,⁷⁷ donde L es la concentración de radioligando y K_D su constante de disociación.

3.3.1. Receptor 5-HT_{1A}. Las membranas (6.4 mg/mL) se homogeneizan en 200 volúmenes del tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM, MgSO₄ 0.5 mM, pH = 7.4 a 25 °C). Se toman

alícuotas de 15 mL que se congelan a -80 °C hasta el momento de su utilización. Fracciones de 500 µL de la suspensión de las membranas se incuban durante 120 min a 37 °C con [³H]-OH-DPAT (2 nM), en presencia o ausencia de un intervalo de concentraciones (10^{-5} - 10^{-10} M) del compuesto objeto de estudio en un volumen final de 550 µL del tampón de incubación. La unión no específica se determina con serotonina 10 µM y constituye menos del 10% de la unión total.

3.3.2. Receptor 5-HT_{2A}. Las membranas (5.0 mg/mL) se homogeneizan en 200 volúmenes del tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 0.5 mM, 10% sacarosa, pH = 7.4 a 25 °C). Fracciones de 500 µL de la suspensión de las membranas se incuban durante 120 min a 37 °C con [³H]ketanserina (1 nM), en presencia o ausencia de un intervalo de concentraciones (10^{-5} - 10^{-10} M) del compuesto objeto de estudio en un volumen final de 550 µL del tampón de incubación. La unión no específica se determina con mianserina 20 µM y constituye menos del 10% de la unión total.

3.3.3. Receptor 5-HT_{5A}. Las membranas (6.0 mg/mL) se homogeneizan en 200 volúmenes del tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM, 0.3 % BSA, pH = 7.4 a 25 °C). Fracciones de 500 µL de la suspensión de las membranas se incuban durante 60 min a 27 °C con [³H]LSD (1 nM), en presencia o ausencia de un intervalo de concentraciones (10^{-5} - 10^{-10} M) del compuesto objeto de estudio en un volumen final de 550 µL del tampón de incubación. La unión no específica se determina con 5-carboxamidotriptamina 10 µM y constituye menos del 10% de la unión total.

3.3.4. Receptor 5-HT₆. Las membranas (6.0 mg/mL) se homogeneizan en 200 volúmenes del tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 0.5 mM, pH = 7.4 a 25 °C). Fracciones de 500 µL de la suspensión de las membranas se incuban durante 60 min a 37 °C con [³H]LSD (1 nM), en presencia o ausencia de un intervalo de concentraciones (10^{-5} - 10^{-10} M) del compuesto objeto de estudio en un volumen final de 550 µL del tampón de incubación. La unión no específica se determina con 100 µM y constituye menos del 10% de la unión total.

3.3.5. Receptor 5-HT₇. Las membranas (6.8 mg/mL) se homogeneizan en 200 volúmenes del tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM, MgSO₄ 10 mM, EDTA 0.5 mM, pH = 7.4 a 25 °C). Fracciones de 500 µL de la suspensión de las membranas se incuban durante 120 min a 27 °C con [³H]LSD (1 nM), en presencia o ausencia de un intervalo de concentraciones (10^{-5} - 10^{-10} M) del compuesto objeto de estudio en un volumen final de 550 µL del tampón de incubación. La unión no específica se determina con clozapina 25 µM y constituye menos del 15% de la unión total.

3.4. Medida de las propiedades fluorescentes

Las medidas de fluorescencia se han llevado a cabo en un espectrómetro PerkinElmer LS50B, empleando 2 mL de disolución en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Todas ellas se han corregido mediante la sustracción del blanco correspondiente. Todas las medidas se han procesado con el programa FL WinLab.

Las disoluciones de los compuestos se han preparado a partir de disoluciones 1 mM de dichos compuestos en DMSO por dilución con el tampón de incubación del ensayo de afinidad (Tris·HCl 50 mM, MgSO₄ 0.5 mM, pH = 7.4 a 25 °C) hasta una concentración de 10 nM.

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_f) se han calculado con respecto a sulfato de quinina (Aldrich) en H₂SO₄ 0.1 M como estándar ($\Phi_f = 0.54$). Las disoluciones, tanto de muestra como de referencia, se han preparado a partir de una disolución stock cuya absorbancia fue inferior a 0.1 a la misma longitud de onda de excitación (350 nm). Las medidas de fluorescencia se han realizado con los mismos parámetros instrumentales para todas las disoluciones. La integral de la intensidad de emisión corregida se representa frente a la absorbancia y los datos se ajustan a una recta. Los valores absolutos se calculan utilizando muestras estándar de rendimiento cuántico conocido, según la siguiente ecuación.

$$\phi_{f,x} = \phi_{f,s} \frac{F_x}{F_s} \frac{A_s}{A_x} \left(\frac{\eta_x}{\eta_s} \right)^2 = \phi_{f,s} \frac{\text{pendiente}_x}{\text{pendiente}_s} \left(\frac{\eta_x}{\eta_s} \right)^2$$

Donde A es la absorbancia a la longitud de onda de excitación, F es el área de la curva de emisión, η es el índice de refracción del disolvente y la pendiente se refiere a la recta obtenida de representar la emisión corregida frente a la absorbancia de la muestra (X) y del estándar (S). La corrección del índice de refracción $(\eta_x/\eta_s)^2$, al tratarse de disoluciones acuosas diluidas, es muy próxima a uno (0.9997) y por lo tanto no se ha tenido en cuenta.

3.5. Experimentos de visualización celular

3.5.1. Visualización en células CHO transfectadas

Los experimentos de visualización celular se han llevado a cabo utilizando células CHO transfectadas con el receptor humano 5-HT_{1A} cedidas por el profesor Probal Banerjee (College of Staten Island CUNY, New York, USA). Las células se cultivan en un medio D-DMEM/F-12 (Invitrogen) suplementado con suero bovino (10%, *fetal bovine serum*, FBS, Gibco), una disolución de penicilina-estreptavidina (1%, Gibco) y geneticina (200 µg/mL, Gibco) en una atmósfera de CO₂ al 5% y 37 °C. Para los estudios de visualización, las células se han cultivado en cubresustancias de vidrio previamente tratados con gelatina, en placas de 24 pocillos con una densidad de 8000 células por pocillo, durante 48 h en las mismas condiciones.

Se han utilizado disoluciones stock 1 mM en DMSO de cada compuesto, diluidas hasta la concentración del ensayo en tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*, PBS) estéril, de forma que la cantidad final de DMSO es menor del 1%.

En los estudios de visualización directa con la sonda **9**, se elimina el medio de cultivo, las células se lavan con tampón fosfato PBS y se incuban en presencia o ausencia de la sonda (250 nM) durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación las células se lavan con PBS y se fijan con paraformaldehído (PFA) al 2% durante 5 min. Las preparaciones se lavan con PBS antes de montarlas en portaobjetos de vidrio con Immu-mount (Thermo Scientific). Las imágenes de fluorescencia se han obtenido con un microscopio confocal Leica SP2 con el objetivo de inmersión de aceite 63X, 1.4 NA (excitación a 405 nm y ventana de emisión a 461-568 nm). El marcaje no específico se ha determinado en presencia de ligando **1** (50 μ M).

En el caso de los estudios de visualización utilizando la sonda **17**, para evitar la unión no específica, se bloquea la biotina endógena antes de la incubación con la sonda. Así, en este caso, se elimina el medio de cultivo, las células se lavan con PBS y se tratan de forma consecutiva con los reactivos A y B bloqueantes de la biotina endógena (*Endogenous Biotin-blocking Kit*, Invitrogen) durante 20 min, siguiendo las indicaciones del fabricante. A continuación las células se lavan con PBS y se incuban en presencia o ausencia de la sonda (500 nM) durante 10 min a temperatura ambiente. Las células se lavan con PBS y se fijan con PFA al 2% durante 5 min. Se lavan de nuevo con PBS y se incuban con Estreptavidina-Alexa Flúor 488 (1:1000 en PBS, Invitrogen) durante 45 min a temperatura ambiente. Las preparaciones se lavan con PBS y los núcleos de las células se marcan con una disolución de Hoechst-33258 (5 μ g/mL) durante 10 min a temperatura ambiente. Las preparaciones se lavan con PBS antes de montarlas en portaobjetos de vidrio con Immu-mount. Las imágenes de fluorescencia se han obtenido con un microscopio Zeiss Axioplan 2, con el programa Metamorph-Offline 6.2. El marcaje no específico se ha determinado en presencia de ligando **1** (50 μ M).

3.5.2. Visualización en neuronas

Los experimentos de visualización del receptor 5-HT_{1A} en sistemas nativos se han llevado a cabo en neuronas de hipocampo de rata en cultivo primario en alta densidad proporcionadas por la Dra. Carmen Guaza (Instituto Cajal del CSIC), crecidas en cubresustancias de vidrio previamente tratados con poli-lisina.

En los estudios de visualización con la sonda selectiva **19**, se elimina el medio de cultivo, las neuronas se lavan con PBS y se fijan con PFA al 4% en PBS durante 10 min a 0 °C. A continuación las preparaciones se lavan con PBS y se incuban con la sonda (2.5 μ M) durante 60 min a temperatura ambiente. Las células se lavan de nuevo con PBS y se incuban con Estreptavidina-Alexa Flúor 488 (1:1000 en PBS, Invitrogen) durante 60 min a temperatura

ambiente. Las preparaciones se lavan con PBS seguido de PBS-T (tampón PBS con un 0.1% de tritón) y los núcleos de las células se marcan con DAPI (1:1000 en PBS de una disolución inicial 500 µg/mL) durante 15 min a temperatura ambiente. Las preparaciones se lavan con PBS estéril antes de montarlas en portaobjetos de vidrio con Immu-mount. Las preparaciones se han observado con un microscopio confocal Leica SP2 con el objetivo de inmersión de aceite 40X, 1.4 NA (excitación a 405 nm y ventana de emisión a 461-568 nm).

En el caso de los estudios de inmunocitoquímica y co-localización de la sonda **19** con el anticuerpo 5-HT_{1A} H-119, tras la incubación con la sonda **19** (2.5 µM) y antes del marcaje de los núcleos con DAPI, las neuronas se lavan con PBS seguido de PBS-T y se tratan con el anticuerpo primario de conejo anti-5-HT_{1A} (H-119, Santa Cruz, 1:500 en PBS con un 4% de suero de cabra (*normal goat serum*, NGS) durante 2 h a temperatura ambiente. Las preparaciones se lavan de nuevo con PBS-T y se incuban con el anticuerpo secundario correspondiente Alexa Flúor 633 (Invitrogen, 1:1000 en PBS con un 1% de NGS) durante 60 min a temperatura ambiente.

3.6. Experimentos de proteómica

3.6.1. Marcaje de proteínas de membranas celulares en gel de poliacrilamida

Las membranas de células HEK293 transfectadas con el receptor 5-HT_{1A} (6.4 mg/mL, Perkin Elmer) se homogeneizan en 2 volúmenes del tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM, MgSO₄ 0.5 mM, pH = 7.4 a 25 °C) y se toman alícuotas de 140 µL que se congelan a -80 °C hasta el momento de su utilización. La proteína Hsp60 se prepara en alícuotas de 6 µL a una concentración de 1 mg/mL en PBS y se almacena a -80 °C hasta el momento de su utilización.

Visualización de proteínas en geles de poliacrilamida con sondas fluorescentes

Fracciones de 15.6 µL (3.2 µg/µL de proteína) de la suspensión de las membranas de células HEK293, o alícuotas de 2 µL de Hsp60 (1 mg/ml en PBS) se incuban durante 30 min a 37 °C con la sonda correspondiente (**82** u **83**) a una concentración de 0.5 a 5 µM en un volumen final de 50 µL del tampón de incubación, en una placa de 96 pocillos de poliestireno y se irradian a 360 nm durante 1 h a 0 °C. A continuación, se añaden 50 µL de una disolución de β-mercaptoetanol en tampón Laemli al 5% (BioRad) y se calienta a 80 °C durante 10 min para disolver las proteínas. Se toman 50 µL de cada muestra y se separan (25 µg/carril) mediante 1D SDS-PAGE (10% de poliacrilamida). Los geles se visualizan en un escáner de fluorescencia Typhoon 9400.

Visualización de proteínas en geles de poliacrilamida mediante química clic⁹⁵

Alícuotas de 2 µL de Hsp60 (1 mg/ml en PBS) se incuban durante 30 min a 37 °C en presencia o ausencia de la sonda dual **84** (10 µM; 1 µL de una disolución 450 µM en PPS con un 45% de DMSO) en un volumen final de 45 µL de PBS en una placa de 96 pocillos de poliestireno y se irradian a 360 nm durante 1 h a 0 °C. A continuación cada muestra se transfiere a un microtubo eppendorf para llevar a cabo la reacción de química clic, y se añaden los reactivos hasta un volumen final de 50 µL: 1 µL de una disolución 5 mM de TriN_3 en DMSO, 1 µL de una disolución acuosa 2.5 mM de ascorbato monosódico y 2 µL de una disolución 2.5 mM de TBTA en DMSO:BuOH 1:4. Se agita en un vórtex y se añade 1 µL de una disolución acuosa 50 mM de CuSO_4 . Se agita en un vórtex, y se incuba 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se añaden 50 µL de una disolución de β -mercaptoetanol en tampón Laemli al 5% (BioRad) y se calienta a 80 °C durante 10 min para disolver las proteínas. Se toman 50 µL de cada muestra y se separan (1 µg/carril) mediante 1D SDS-PAGE (10% de poliacrilamida). Los geles se visualizan en un escáner de fluorescencia Typhoon 9400.

3.6.2. Determinación del perfil de proteínas unidas a los ligandos mediante espectrometría de masas

Las membranas de células HEK293 transfectadas con el receptor 5-HT_{1A} (6.4 mg/mL, Perkin Elmer) se homogeneizan en 2 volúmenes del tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM, MgSO_4 0.5 mM, pH = 7.4 a 25 °C). Fracciones de 500 µL se incuban con la sonda **64** (5 µM) durante 30 min a 37 °C (volumen total = 600 µL), en una placa de 24 pocillos de poliestireno y se irradian a 360 nm durante 1 h a 0 °C. Se transfiere cada muestra a un microtubo eppendorf, se añaden 100 µL de una disolución de tritón en PBS al 7% y se agita durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se añaden 50 µL de una disolución de dodecilsulfato sódico (SDS) en agua al 4% y 50 µL de PBS. A continuación, se añaden 100 µL de una resina de agarosa-estreptavidina (Pierce) y se agita a 4 °C durante 12 h. Se transfieren las muestras a un tubo falcon y se lava la resina sucesivamente con una disolución de SDS en PBS al 0.2 % (1x10 mL), PBS (3x10 mL) y agua (3x10 mL), centrifugando a 2500 rpm durante 2 min después de cada lavado. Se transfiere a un microtubo eppendorf y se elimina el sobrenadante, se añaden 500 µL de una disolución de urea 6 M en PBS y 25 µL de una disolución 250 mM de tris(2-carboxietil)fosfina en agua y se incuba durante 30 min con agitación. A continuación, se añaden 25 µL de una disolución 400 mM de iodoacetamida en agua y se incuba durante 30 min con agitación y protegido de la luz. Se diluye con 800 µL de PBS y se lava 3 veces con 1 mL de PBS, centrifugando a 4000 rpm durante 3 min después de cada lavado. Tras la digestión trípica, los péptidos se analizan por LC-MS/MS.

Las proteínas aisladas con la sonda dual **64**, se cargan en un gel y se concentran mediante SDS-PAGE en una única banda. A continuación, se realiza una tinción con azul de coomassie (G-250) para poder cortar dicha banda en trozos de 1 mm³, que se lavan con agua. Las muestras se reducen y se alquilan y se realiza la digestión triptica a 37 °C durante toda la noche, añadiendo tripsina porcina (Promega) hasta una relación tripsina:proteína final de 1:20. Los péptidos obtenidos tras la digestión se secan a vacío y se disuelven en una disolución acuosa de ácido fórmico al 0.1% para el análisis por LC-MS/MS. Las muestras se inyectan en una columna C-18 (100 mm x 12 cm, Mediterranean sea, Teknokroma) y se analizan en un gradiente continuo de acetonitrilo de 0% a 50% de B en 90 min seguido de 50% a 90% de B en 1 min (B = acetonitrilo con 0.5% de ácido acético como aditivo), con un flujo de 300 nL/min. Los péptidos se fragmentan en un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher). Para los picos moleculares más intensos se han obtenido los espectros de MS/MS. Un segundo lote de muestras se procesa de la misma forma, se inyecta en una nanocolumna C-18 (Acclaim PepMap100, C18, 3 µm, 100Å, 75 µm x 25 cm) dotada de precolumna (Acclaim PepMap100 nanoViper Column, C18, 3 µm, 75 µm x 2 cm) y se analiza en un gradiente continuo de acetonitrilo de 8% a 31% de B en 120 min seguido de 31% a 90% de B en 1 min (B = acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico como aditivo), con un flujo de 200 nL/min. Los péptidos se fragmentan en un espectrómetro de masas Orbitrap Elite (Thermo Fisher).

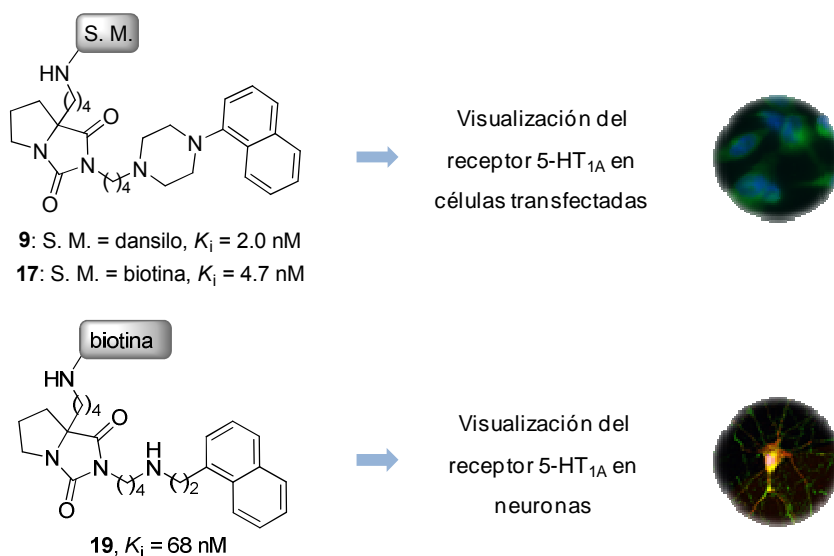
Los espectros de masas obtenidos se han extraído utilizando el programa *Proteome Discoverer v 1.3* (para los datos de Orbitrap XL) o *Proteome Discoverer v1.4* (para los datos de Orbitrap Elite). Se han contrastado los espectros de fragmentaciones frente a una base de datos de proteínas empleando los programas Sequest (Thermo Fisher Scientific, versión 1.0.43.2) y X-Tandem (The GPM, thegpm.org, versión 2007.01.01.1). La búsqueda en Sequest y X-Tandem se lleva a cabo permitiendo dos fragmentaciones tripticas y una tolerancia de 15 ppm (en los espectros de MS) ó 0.8 Da (en los espectros de MS/MS). Se selecciona la alquilación de los residuos de cisteína con iodoacetamida como una modificación fija y la oxidación de los residuos de metionina como una modificación variable. Finalmente se utiliza el programa *Scaffold v.3.00.02* (Proteome software Inc) para validar las identificaciones de proteínas basadas en los espectros de MS/MS.

CONCLUSIONES

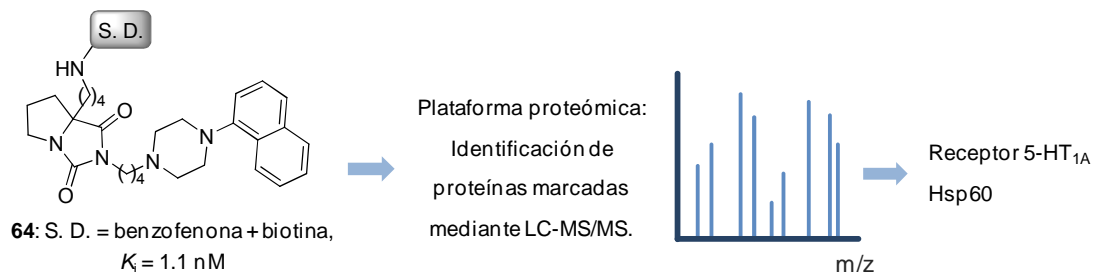
4. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha abordado una nueva metodología basada en sondas químicas dirigidas a GPCRs con el objetivo de obtener información del sistema biológico. En particular se ha seleccionado el receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} por el interés que presenta desde el punto de vista terapéutico. Las sondas desarrolladas están basadas en ligandos del receptor 5-HT_{1A} previamente identificados en nuestro grupo de investigación y presentan diferentes subunidades de marcaje, tales como fluoróforos, biotina, benzofenona o alquino terminal.

Las sondas de gran afinidad **9** y **17** han permitido la visualización del receptor humano 5-HT_{1A} en células transfectadas. Además, la sonda **19**, selectiva frente a otros receptores de serotonina, ha sido utilizada para la visualización del receptor en neuronas de hipocampo de rata en cultivo primario como ejemplo de sistema nativo.



Por otro lado, la sonda dual **64**, marcada con benzofenona y biotina, se ha empleado en el desarrollo de una plataforma proteómica dirigida a la identificación de nuevas dianas terapéuticas. Como prueba de concepto se ha identificado el receptor 5-HT_{1A}, así como otras proteínas de gran potencial, tales como Hsp60, cuya implicación en cáncer se ha descrito recientemente.



En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral constituyen los primeros ejemplos de sondas químicas del receptor 5-HT_{1A} y avalan su empleo en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.

BIBLIOGRAFÍA

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Fredriksson, R.; Lagerström, M. C.; Lundin, L. G.; Schiöth, H. B. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 1256-1272.
2. Stevens, R. C.; Cherezov, V.; Katritch, V.; Abagyan, R.; Kuhn, P.; Rosen, H.; Wuthrich, K. The GPCR network: a large-scale collaboration to determine human GPCR structure and function. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 25-34.
3. Venkatakrisnan, A. J.; Deupi, X.; Lebon, G.; Tate, C. G.; Schertler, G. F.; Babu, M. M. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* **2013**, *494*, 185-194.
4. Lefkowitz, R. J. A brief history of G-protein coupled receptors (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6366-6378.
5. Kobilka, B. The structural basis of G-protein-coupled receptor signaling (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6380-6388.
6. Luttrell, L. M. Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Mol. Biotechnol.* **2008**, *39*, 239-264.
7. Ritter, S. L.; Hall, R. A. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 819-830.
8. Bockaert, J.; Pin, J. P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* **1999**, *18*, 1723-1729.
9. Katritch, V.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2013**, *53*, 531-556.
10. Kang, D. S.; Tian, X.; Benovic, J. L. Role of β -arrestins and arrestin domain-containing proteins in G protein-coupled receptor trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2014**, *27*, 63-71.

11. Hewavitharana, T.; Wedegaertner, P. B. Non-canonical signaling and localizations of heterotrimeric G proteins. *Cell. Signal.* **2012**, *24*, 25-34.
12. Lyssand, J. S.; Bajjalieh, S. M. The heterotrimeric G protein subunit G_{oi} is present on mitochondria. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 5765-5768.
13. Correll, C. C.; McKittrick, B. A. Biased ligand modulation of seven transmembrane receptors (7TMRs): functional implications for drug discovery. *J. Med. Chem.* **2014**, DOI:10.1021/jm401677g.
14. Rominger, D. H.; Cowan, C. L.; Gowen-MacDonald, W.; Violin, J. D. Biased ligands: pathway validation for novel GPCR therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2014**, *16*, 108-115.
15. Wisler, J. W.; Xiao, K.; Thomsen, A. R. B.; Lefkowitz, R. J. Recent developments in biased agonism. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2014**, *27*, 18-24.
16. Lane, J. R.; Sexton, P. M.; Christopoulos, A. Bridging the gap: bitopic ligands of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2013**, *34*, 59-66.
17. Kenakin, T.; Christopoulos, A. Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 205-216.
18. Rahmeh, R.; Damian, M.; Cottet, M.; Orcel, H.; Mendre, C.; Durroux, T.; Sharma, K. S.; Durand, G.; Pucci, B.; Trinquet, E.; Zwier, J. M.; Deupi, X.; Bron, P.; Banères, J. L.; Mouillac, B.; Granier, S. Structural insights into biased G protein-coupled receptor signaling revealed by fluorescence spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 6733-6738.
19. Rajagopal, S.; Rajagopal, K.; Lefkowitz, R. J. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 373-386.
20. Lim, W. K.; Kanelakis, K. C.; Neubig, R. R. Regulation of G protein signaling by the 70 kDa heat shock protein. *Cell. Signal.* **2013**, *25*, 389-396.
21. Langmead, C. J.; Christopoulos, A. Functional and structural perspectives on allosteric modulation of GPCRs. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2014**, *27*, 94-101.
22. Wootten, D.; Christopoulos, A.; Sexton, P. M. Emerging paradigms in GPCR allostery: implications for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 630-644.
23. Lane, J. R.; Abdul-Ridha, A.; Canals, M. Regulation of G protein-coupled receptors by allosteric ligands. *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4*, 527-534.
24. Conn, P. J.; Christopoulos, A.; Lindsley, C. W. Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 41-54.
25. Ferre, S.; Casado, V.; Devi, L. A.; Filizola, M.; Jockers, R.; Lohse, M. J.; Milligan, G.; Pin, J. P.; Guitart, X. G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. *Pharmacol. Rev.* **2014**, *66*, 413-434.

26. Szafran, K.; Faron-Gorecka, A.; Kolasa, M.; Kusmider, M.; Solich, J.; Zurawek, D.; Dziedzicka-Wasylewska, M. Potential role of G protein-coupled receptor (GPCR) heterodimerization in neuropsychiatric disorders: a focus on depression. *Pharmacol. Rep.* **2013**, *65*, 1498-1505.
27. Renner, U.; Zeug, A.; Woehler, A.; Niebert, M.; Dityatev, A.; Dityateva, G.; Gorinski, N.; Guseva, D.; Abdel-Galil, D.; Fröhlich, M.; Döring, F.; Wischmeyer, E.; Richter, D. W.; Neher, E.; Ponimaskin, E. G. Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT_{1A} and 5-HT₇ differentially regulates receptor signalling and trafficking. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 2486-2499.
28. Fribourg, M.; Moreno, J. L.; Holloway, T.; Provasi, D.; Baki, L.; Mahajan, R.; Park, G.; Adney, S. K.; Hatcher, C.; Eltit, J. M.; Ruta, J. D.; Albizu, L.; Li, Z.; Umali, A.; Shim, J.; Fabiato, A.; MacKerell, A. D., Jr.; Brezina, V.; Sealfon, S. C.; Filizola, M.; González-Maeso, J.; Logothetis, D. E. Decoding the signaling of a GPCR heteromeric complex reveals a unifying mechanism of action of antipsychotic drugs. *Cell* **2011**, *147*, 1011-1023.
29. Urizar, E.; Yano, H.; Kolster, R.; Gales, C.; Lambert, N.; Javitch, J. A. CODA-RET reveals functional selectivity as a result of GPCR heteromerization. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 624-630.
30. Fuxe, K.; Marcellino, D.; Leo, G.; Agnati, L. F. Molecular integration via allosteric interactions in receptor heteromers. A working hypothesis. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2010**, *10*, 14-22.
31. Casadó, V.; Cortés, A.; Mallol, J.; Pérez-Capote, K.; Ferré, S.; Lluís, C.; Franco, R.; Canela, E. I. GPCR homomers and heteromers: a better choice as targets for drug development than GPCR monomers? *Pharmacol. Ther.* **2009**, *124*, 248-257.
32. Davenport, A. P.; Harmar, A. J. Evolving pharmacology of orphan GPCRs: IUPHAR Commentary. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *170*, 693-695.
33. Hulme, E. C.; Trevethick, M. A. Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *161*, 1219-1237.
34. Eckard, C. P.; Beck-Sickinger, A. G. Characterisation of G-protein-coupled receptors by antibodies. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 897-910.
35. Tsien, R. Y. Constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox (Nobel lecture). *Integr. Biol.* **2010**, *2*, 77-93.
36. Shimomura, O. Discovery of green fluorescent protein (GFP) (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 5590-5602.
37. Chalfie, M. GFP: lighting up life (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 5603-5611.

38. Granier, S.; Kobilka, B. A new era of GPCR structural and chemical biology. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 670-673.
39. Peters, J.-U. Polypharmacology - foe or friend? *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 8955-8971.
40. Allen, J. A.; Roth, B. L. Strategies to discover unexpected targets for drugs active at G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2011**, *51*, 117-144.
41. Roth, B. L.; Sheffler, D. J.; Kroeze, W. K. Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 353-359.
42. Lin, H.; Sassano, M. F.; Roth, B. L.; Shoichet, B. K. A pharmacological organization of G protein-coupled receptors. *Nat. Methods* **2013**, *10*, 140-146.
43. Lounkine, E.; Keiser, M. J.; Whitebread, S.; Mikhailov, D.; Hamon, J.; Jenkins, J. L.; Lavan, P.; Weber, E.; Doak, A. K.; Cote, S.; Shoichet, B. K.; Urban, L. Large-scale prediction and testing of drug activity on side-effect targets. *Nature* **2012**, *486*, 361-367.
44. Moellering, R. E.; Cravatt, B. F. How chemoproteomics can enable drug discovery and development. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 11-22.
45. Li, J.; Cisar, J. S.; Zhou, C. Y.; Vera, B.; Williams, H.; Rodriguez, A. D.; Cravatt, B. F.; Romo, D. Simultaneous structure-activity studies and arming of natural products by C-H amination reveal cellular targets of eupalmerin acetate. *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 510-517.
46. Evans, M. J.; Cravatt, B. F. Mechanism-based profiling of enzyme families. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3279-3301.
47. Heal, W. P.; Dang, T. H.; Tate, E. W. Activity-based probes: discovering new biology and new drug targets. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 246-257.
48. Cravatt, B. F.; Wright, A. T.; Kozarich, J. W. Activity-based protein profiling: from enzyme chemistry to proteomic chemistry. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 383-414.
49. Wysocki, L. M.; Lavis, L. D. Advances in the chemistry of small molecule fluorescent probes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 752-759.
50. Wilchek, M.; Bayer, E. A. Foreword and introduction to the book (strept)avidin-biotin system. *Biomol. Eng.* **1999**, *16*, 1-4.
51. Preston, G. W.; Wilson, A. J. Photo-induced covalent cross-linking for the analysis of biomolecular interactions. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3289-3301.
52. Edgington, L. E.; Berger, A. B.; Blum, G.; Albrow, V. E.; Paulick, M. G.; Lineberry, N.; Bogoy, M. Noninvasive optical imaging of apoptosis by caspase-targeted activity-based probes. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 967-973.

53. Edgington, L. E.; Verdoes, M.; Ortega, A.; Withana, N. P.; Lee, J.; Syed, S.; Bachmann, M. H.; Blum, G.; Bogyo, M. Functional imaging of legumain in cancer using a new quenched activity-based probe. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 174-182.
54. Dominguez, E.; Galmozzi, A.; Chang, J. W.; Hsu, K.-L.; Pawlak, J.; Li, W.; Godio, C.; Thomas, J.; Partida, D.; Niessen, S.; O'Brien, P. E.; Russell, A. P.; Watt, M. J.; Nomura, D. K.; Cravatt, B. F.; Saez, E. Integrated phenotypic and activity-based profiling links Ces3 to obesity and diabetes. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 113-121.
55. Arastu-Kapur, S.; Ponder, E. L.; Fonovic, U. P.; Yeoh, S.; Yuan, F.; Fonovic, M.; Grainger, M.; Phillips, C. I.; Powers, J. C.; Bogyo, M. Identification of proteases that regulate erythrocyte rupture by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 203-213.
56. Staub, I.; Sieber, S. A. Beta-lactam probes as selective chemical-proteomic tools for the identification and functional characterization of resistance associated enzymes in MRSA. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6271-6276.
57. Zuhl, A. M.; Mohr, J. T.; Bachovchin, D. A.; Niessen, S.; Hsu, K.-L.; Berlin, J. M.; Dochnahl, M.; López-Alberca, M. P.; Fu, G. C.; Cravatt, B. F. Competitive activity-based protein profiling identifies aza- β -lactams as a versatile chemotype for serine hydrolase inhibition. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5068-5071.
58. Bachovchin, D. A.; Cravatt, B. F. The pharmacological landscape and therapeutic potential of serine hydrolases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11*, 52-68.
59. Shannon, D. A.; Gu, C.; McLaughlin, C. J.; Kaiser, M.; van der Hoorn, R. A. L.; Weerapana, E. Sulfonyl fluoride analogues as activity-based probes for serine proteases. *ChemBioChem*. **2012**, *13*, 2327-2330.
60. Paulick, M. G.; Bogyo, M. Development of activity-based probes for cathepsin X. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 563-572.
61. Saghatelian, A.; Jessani, N.; Joseph, A.; Humphrey, M.; Cravatt, B. F. Activity-based probes for the proteomic profiling of metalloproteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 10000-10005.
62. Tantama, M.; Lin, W. C.; Licht, S. An activity-based protein profiling probe for the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15766-15767.
63. Vernall, A. J.; Hill, S. J.; Kellam, B. The evolving small-molecule fluorescent-conjugate toolbox for class A GPCRs. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 1073-1084.
64. Lacivita, E.; Di Pilato, P.; De Giorgio, P.; Colabufo, N. A.; Berardi, F.; Perrone, R.; Leopoldo, M. The therapeutic potential of 5-HT_{1A} receptors: a patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2012**, *22*, 887-902.

65. Valhondo, M.; Marco, I.; Martín-Fontecha, M.; Vázquez-Villa, H.; Ramos, J. A.; Berkels, R.; Lauterbach, T.; Benhamú, B.; López-Rodríguez, M. L. New serotonin 5-HT_{1A} receptor agonists endowed with antinociceptive activity in vivo. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7851-7861.
66. Marco, I.; Valhondo, M.; Martín-Fontecha, M.; Vázquez-Villa, H.; Del Rio, J.; Planas, A.; Sagredo, O.; Ramos, J. A.; Torrecillas, I. R.; Pardo, L.; Frechilla, D.; Benhamú, B.; López-Rodríguez, M. L. New serotonin 5-HT_{1A} receptor agonists with neuroprotective effect against ischemic cell damage. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7986-7999.
67. López-Rodríguez, M. L.; Morcillo, M. J.; Fernández, E.; Benhamú, B.; Tejada, I.; Ayala, D.; Viso, A.; Campillo, M.; Pardo, L.; Delgado, M.; Manzanares, J.; Fuentes, J. A. Synthesis and structure-activity relationships of a new model of arylpiperazines. 8. Computational simulation of ligand-receptor interaction of 5-HT_{1A}R agonists with selectivity over α_1 -adrenoceptors. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2548-2558.
68. López-Rodríguez, M. L.; Ayala, D.; Viso, A.; Benhamú, B.; de La Pradilla, R. F.; Zarza, F.; Ramos, J. A. Synthesis and structure-activity relationships of a new model of arylpiperazines. Part 7: study of the influence of lipophilic factors at the terminal amide fragment on 5-HT_{1A} affinity/selectivity. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 1551-1557.
69. López-Rodríguez, M. L.; Morcillo, M. J.; Fernández, E.; Rosado, M. L.; Pardo, L.; Schaper, K. Synthesis and structure-activity relationships of a new model of arylpiperazines. Study of the 5-HT_{1A}/ α_1 -adrenergic receptor affinity by classical hansch analysis, artificial neural networks, and computational simulation of ligand recognition. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 198-207.
70. López-Rodríguez, M. L.; Morcillo, M. J.; Fernández, E.; Porras, E.; Orensanz, L.; Beneytez, M. E.; Manzanares, J.; Fuentes, J. A. Synthesis and structure-activity relationships of a new model of arylpiperazines. 5. Study of the physicochemical influence of the pharmacophore on 5-HT_{1A}/ α_1 -adrenergic receptor affinity: synthesis of a new derivative with mixed 5-HT_{1A}/D₂ antagonist properties. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 186-197.
71. López-Rodríguez, M. L.; Morcillo, M. J.; Rovat, T. K.; Fernández, E.; Vicente, B.; Sanz, A. M.; Hernández, M.; Orensanz, L. Synthesis and structure-activity relationships of a new model of arylpiperazines. 4. 1-[omega-(4-Arylpiperazin-1-yl)alkyl]-3-(diphenylmethylene)-2,5-pyrrolidinediones and -3-(9H-fluoren-9-ylidene)-2,5-pyrrolidinediones: study of the steric requirements of the terminal amide fragment on 5-HT_{1A} affinity/selectivity. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 36-49.
72. López-Rodríguez, M. L.; Morcillo, M. J.; Fernández, E.; Porras, E.; Murcia, M.; Sanz, A. M.; Orensanz, L. Synthesis and structure-activity relationships of a new model of arylpiperazines. 3. 2-[omega-(4-arylpiperazin-1-yl)alkyl]perhydropyrrolo[1,2-c]imidazoles and -

perhydroimidazo[1,5-a]pyridines: study of the influence of the terminal amide fragment on 5-HT_{1A} affinity/selectivity. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2653-2656.

73. López-Rodríguez, M. L.; Rosado, M. L.; Benhamú, B.; Morcillo, M. J.; Fernández, E.; Schaper, K. J. Synthesis and structure-activity relationships of a new model of arylpiperazines. 2. Three-dimensional quantitative structure-activity relationships of hydantoin-phenylpiperazine derivatives with affinity for 5-HT_{1A} and α_1 receptors. A comparison of CoMFA models. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1648-1656.

74. López-Rodríguez, M. L.; Rosado, M. L.; Benhamú, B.; Morcillo, M. J.; Sanz, A. M.; Orensanz, L.; Beneitez, M. E.; Fuentes, J. A.; Manzanares, J. Synthesis and structure-activity relationships of a new model of arylpiperazines: a selective 5-HT_{1A} receptor agonist. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4439-4450.

75. Dakin, H. D. Amino-acids of gelatin. *J. Biol. Chem.* **1920**, *44*, 499-529.

76. Sashuk, V.; Schoeps, D.; Plenio, H. Fluorophore tagged cross-coupling catalysts. *Chem. Commun.* **2009**, 770-772.

77. Cheng, Y.; Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099-3108.

78. Alonso, D.; Vázquez-Villa, H.; Gamo, A. M.; Martínez-Esperón, M. F.; Tortosa, M.; Viso, A.; Fernández de la Pradilla, R.; Junquera, E.; Aicart, E.; Martín-Fontecha, M.; Benhamú, B.; López-Rodríguez, M. L.; Ortega-Gutiérrez, S. Development of fluorescent ligands for the human 5-HT_{1A} receptor. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 249-253.

79. Chalmers, D. T.; Watson, S. J. Comparative anatomical distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA and 5-HT_{1A} binding in rat brain - a combined in situ hybridisation/in vitro receptor autoradiographic study. *Brain Res.* **1991**, *561*, 51-60.

80. Gomes, I.; Gupta, A.; Filipovska, J.; Szeto, H. H.; Pintar, J. E.; Devi, L. A. A role for heterodimerization of mu and delta opiate receptors in enhancing morphine analgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 5135-5139.

81. Ciruela, F.; Vilardaga, J. P.; Fernández-Dueñas, V. Lighting up multiprotein complexes: lessons from GPCR oligomerization. *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 407-415.

82. Ferré, S.; Franco, R. Oligomerization of G-protein-coupled receptors: a reality. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2010**, *10*, 1-5.

83. Paila, Y. D.; Kombrabail, M.; Krishnamoorthy, G.; Chattopadhyay, A. Oligomerization of the serotonin 1A receptor in live cells: a time-resolved fluorescence anisotropy approach. *J. Phys. Chem.* **2011**, *115*, 11439-11447.

84. Kobe, F.; Renner, U.; Woehler, A.; Wlodarczyk, J.; Papusheva, E.; Bao, G.; Zeug, A.; Richter, D. W.; Neher, E.; Ponimaskin, E. Stimulation- and palmitoylation-dependent changes in oligomeric conformation of serotonin 5-HT_{1A} receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1783*, 1503-1516.
85. Lukasiewicz, S.; Blasiak, E.; Faron-Gorecka, A.; Polit, A.; Tworzydło, M.; Gorecki, A.; Wasylewski, Z.; Dziedzicka-Wasylewska, M. Fluorescence studies of homooligomerization of adenosine A_{2A} and serotonin 5-HT_{1A} receptors reveal the specificity of receptor interactions in the plasma membrane. *Pharmacol. Rep.* **2007**, *59*, 379-392.
86. Albizu, L.; Cottet, M.; Kralikova, M.; Stoev, S.; Seyer, R.; Brabet, I.; Roux, T.; Bazin, H.; Bourrier, E.; Lamarque, L.; Breton, C.; Rives, M. L.; Newman, A.; Javitch, J.; Trinquet, E.; Manning, M.; Pin, J. P.; Mouillac, B.; Durroux, T. Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 587-594.
87. Salim, K.; Fenton, T.; Bacha, J.; Urien-Rodriguez, H.; Bonnert, T.; Skynner, H. A.; Watts, E.; Kerby, J.; Heald, A.; Beer, M.; McAllister, G.; Guest, P. C. Oligomerization of G-protein-coupled receptors shown by selective co-immunoprecipitation. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 15482-15485.
88. Cottet, M.; Faklaris, O.; Maurel, D.; Scholler, P.; Doumazane, E.; Trinquet, E.; Pin, J. P.; Durroux, T. BRET and time-resolved FRET strategy to study GPCR oligomerization: from cell lines toward native tissues. *Front. Endocrinol.* **2012**, *3*, 92.
89. Wahlstrom, J. L.; Randall, M. A., Jr.; Lawson, J. D.; Lyons, D. E.; Siems, W. F.; Crouch, G. J.; Barr, R.; Facemyer, K. C.; Cremo, C. R. Structural model of the regulatory domain of smooth muscle heavy meromyosin. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 5123-5131.
90. Chen, I.; Howarth, M.; Lin, W.; Ting, A. Y. Site-specific labeling of cell surface proteins with biophysical probes using biotin ligase. *Nat. Methods* **2005**, *2*, 99-104.
91. Lappano, R.; Maggiolini, M. G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 47-60.
92. Lin, X.; Huang, X. P.; Chen, G.; Whaley, R.; Peng, S.; Wang, Y.; Zhang, G.; Wang, S. X.; Wang, S.; Roth, B. L.; Huang, N. Life beyond kinases: structure-based discovery of sorafenib as nanomolar antagonist of 5-HT receptors. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5749-5759.
93. Fiorino, F.; Severino, B.; Magli, E.; Ciano, A.; Caliendo, G.; Santagada, V.; Frecentese, F.; Perissutti, E. 5-HT_{1A} Receptor: an old target as a new attractive tool in drug discovery from central nervous system to cancer. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4407-4426.
94. Tabares-Seisdedos, R.; Rubenstein, J. L. Inverse cancer comorbidity: a serendipitous opportunity to gain insight into CNS disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **2013**, *14*, 293-304.

95. Speers, A. E.; Cravatt, B. F. Profiling enzyme activities in vivo using click chemistry methods. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 535-546.
96. Tamura, T.; Tsukiji, S.; Hamachi, I. Native FKBP12 engineering by ligand-directed tosyl chemistry: labeling properties and application to photo-cross-linking of protein complexes in vitro and in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2216-2226.
97. Nyffeler, P. T.; Liang, C. H.; Koeller, K. M.; Wong, C. H. The chemistry of amine-azide interconversion: catalytic diazotransfer and regioselective azide reduction. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10773-10778.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR PROBES: APPLICATION TO THE SEROTONIN RECEPTOR 5-HT_{1A}

1. BACKGROUND AND AIMS

The G protein-coupled receptors (GPCRs) constitute one of the largest membrane receptor families. They are involved in most physiological processes and are targeted by over 30% of the current marketed drugs.¹ However, the understanding of their signal transduction mechanism is still far from being completely understood. In this sense, the use of compounds that enable direct observation of sub-fractions of the proteome in native systems has become of paramount importance in the quest of understanding biological processes. Furthermore, the development of methods to profile the different targets and off-targets of a particular ligand and to associate these with undesired side effects or with new therapeutic applications has attracted intense interest. In this context, activity-based protein profiling can be considered as one of the major contributions.² This technology uses activity-based probes (ABPs) to react with certain classes of enzymes depending on their state of activity in biological systems. An ABP consists of three basic elements: a reactive functional group that covalently reacts with the enzyme active site, a linker region that prevents steric congestion, and a reporter tag used for the direct visualization, identification, or isolation of the probe-labelled proteins (Fig. 1).³ The most commonly used tags are fluorophores and biotin for visualization, target isolation and identification. Furthermore, small bioorthogonal chemical groups (such as alkynes or azides) could be considered to reduce the bulkiness of the probe. In this case and once the probe has reacted with the target, the tag is introduced using click chemistry.



Figure 1. Design of an ABP.

This approach has been successfully applied to the study of different enzyme families and has been extended to the nicotinic acetylcholine receptor ion channel.⁴ However, the superfamily of GPCRs remains to be addressed. We have started a project aimed at the development of probes for the study of GPCRs. In particular we have focused our efforts on serotonin 5-HT_{1A} receptors, due to their clinical significance and our previous experience.⁵⁻⁷

The main objective of this research work is the development of new molecular probes to study the biological system. These probes intend to allow the visualization of the 5-HT_{1A}R in live cells, and they will be employed in a proteomic platform aimed at the identification and profiling of ligand-interacting proteins (off targets and new therapeutic targets). Our methodology encompasses the design of labelled ligands, the synthesis of the designed compounds, and their evaluation as chemical probes in biological systems of increasing complexity.

2. RESULTS AND DISCUSSION

• Probes for cell visualization of the 5-HT_{1A}R

The main distinction between ABPs and GPCR probes is that the latter are directed toward receptors that do not have a catalytic center, which makes necessary to follow a different approach for the design of the probe. Since GPCR probes should achieve labelling by non-covalent binding at a specific site of the protein, the reactive group of the ABP has to be replaced by a binding group, a fragment with affinity for the receptor under study that makes the labelling specific. The design of new probes for the 5-HT_{1A}R was based on our previously reported potent agonists **1-4** (Fig. 2), which were selected due to their high affinity (**1**, **2**) and selectivity profile against other serotonin receptors (**3**, **4**).⁶⁻⁹ Extensive structure-activity relationship (SAR) studies previously carried out in our research group have allowed us to identify the molecular determinants of the ligand-receptor interaction.¹⁰

Regarding the labelling tags, we have used the fluorophores dansyl (Ds), 7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazole-4-yl (NBD) and lissamin, as well as biotin due to the great variety of commercially available streptavidin-fluorophore conjugates. Furthermore, a terminal alkyne has been also considered in the design of fluorescent probes, since the fluorescent tag can be introduced after incubation by click chemistry in the case that the probe does not admit any bulky tag. Thus, we have synthesized the labelled compounds **5-22** (Fig. 2), where the tags have been introduced in the selected 5-HT_{1A}R ligands by a) replacement of the aromatic moiety by the tag (**5-8**) and b) alkylation at the bridgehead carbon of the bicyclohydantoin using an aliphatic chain as linker (**9-22**).

Once the labelled compounds were obtained, we evaluated their affinity by radioligand binding assays and their fluorescent properties. With respect to the affinity, when the aromatic moiety of the parent ligands was replaced by the fluorescent tag, the labelled compounds **5-8** (Fig. 2) lost the affinity for the 5-HT_{1A}R or were poorly fluorescent. However, high 5-HT_{1A}R affinity compounds were obtained when the tag was attached through a linker to the tertiary carbon of the bicyclohydantoin (derivatives **9-22**, Fig. 2). On the other hand, the study of their fluorescent properties showed that, in general, naphthyl derivatives bearing the dansyl group in the bridgehead carbon of the bicyclohydantoin exhibit the highest intensity of emission I_{em}

values and fluorescent quantum yields Φ_f [e.g. $I_{em}(\mathbf{9}) > 1000$ au for an emission slit of 2.5 nm, $\Phi_f(\mathbf{9}) = 0.26$, Fig. 4]. Within the set of synthesized labelled ligands, the fluorescent compound **9** ($K_i = 2.0$ nM, Fig. 3) and the biotinylated derivative **17** ($K_i = 4.7$ nM, Fig. 3) showed the best affinity values for the 5-HT_{1A}R, whereas the biotinylated ligand **21** had the best selectivity profile [$K_i(5\text{-HT}_{1A}) = 68$ nM, $K_i(5\text{-HT}_{2A-7}) > 800$ nM, Fig. 4]. Therefore, labelled ligands **9**, **17** and **19** were selected for the visualization of the 5-HT_{1A}R.

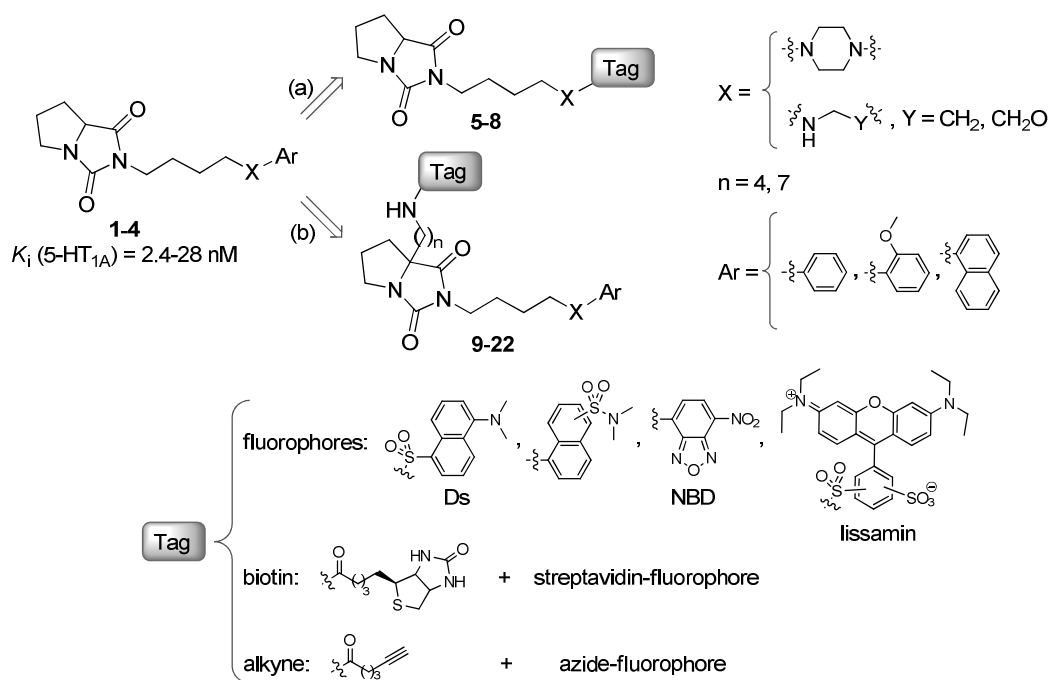


Figure 2. Design of chemical probes for 5-HT_{1A}R visualization in cells.

To set up the 5-HT_{1A}R visualization experiments, we used stably transfected CHO cells as biological systems and the labelled compounds **9** and **17** (Fig. 3). The incubation of cells with probe **9** (250 nM) or **17** (500 nM), followed by treatment with a fluorescent streptavidin conjugate in the case of **17**, allowed the direct observation of the human 5-HT_{1A}R in cells (Fig. 3A and 3B, respectively).¹¹

Next, the potential of labelled ligands as probes for visualization of the 5-HT_{1A}R was explored in native cell systems. Thus, we assessed the performance of selective probe **19** in neurons from rat hippocampus due to the high expression of the 5-HT_{1A}R. As shown in Fig. 4, probe **19** is able to label the 5-HT_{1A}R in neurons in primary culture (Fig. 4A). This labelling was further confirmed by double staining with a commercial antibody against this receptor (Fig. 4B).

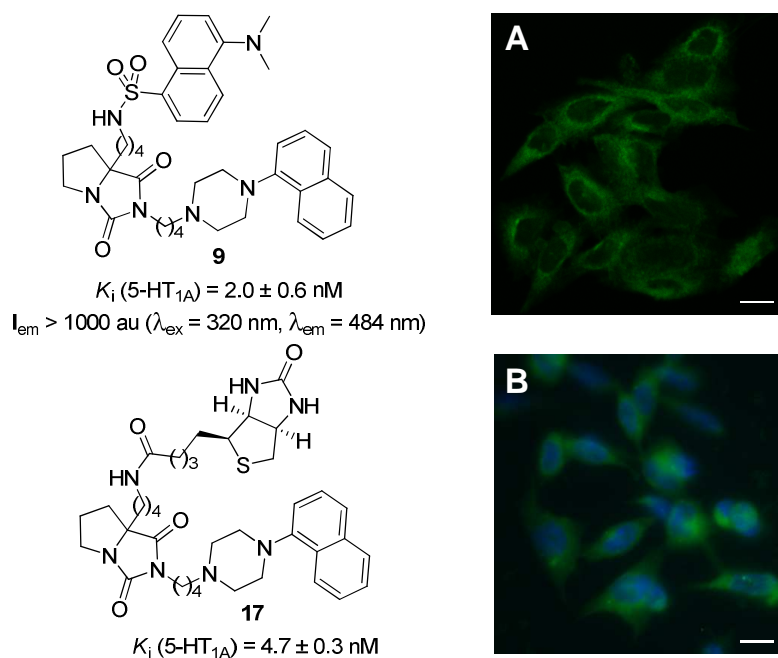


Figure 3. CHO cells stably transfected with the human 5-HT_{1A}R were incubated in the presence of probe **9** (250 nM) (A) or **17** (500 nM) followed by treatment with streptavidin-Alexa FluorTM 488 conjugate (B).

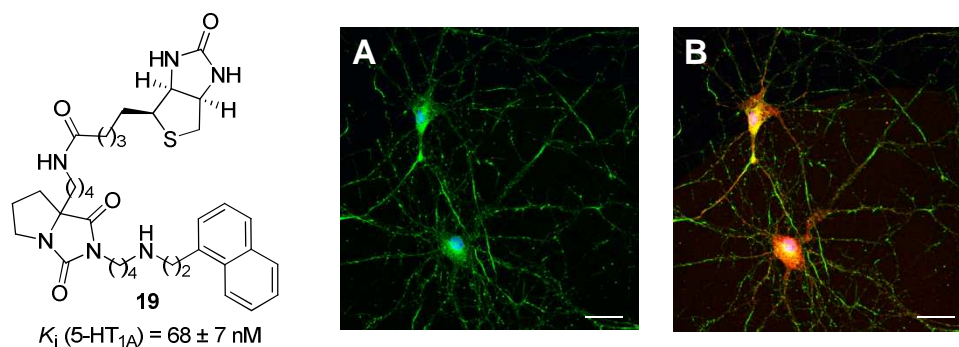


Figure 4. Neurons from rat hippocampus were incubated in the presence of selective probe **19** (2.5 μ M), followed by treatment with streptavidin-Alexa FluorTM 488 conjugate (A), or 5-HT_{1A}R antibody (H-119, Santa Cruz) merge image (B). The scale bar represents 20 μ m.

• Probes to identify off-targets of 5-HT_{1A}R ligands

We envisioned a proteomic platform aimed at profiling the different targets and off-targets of a GPCR ligand. Due to the lack of covalent binding between a GPCR ligand and the receptor, dual probes that contain the following three general features are required: (i) a photoreactive group for ultraviolet (UV) light-induced cross-linking to targeted proteins such as benzophenone; (ii) a biotin subunit, which enables enrichment and subsequent identification of bound proteins;

and (iii) a scaffold with affinity for the GPCR under study that after introduction of the photo-cross-linking and biotin subunits would still keep the affinity for the GPCR and, by extension, for the rest of the off-targets (or most of them). The proteomic studies applied to GPCRs involve, in a stepwise manner, treatment of proteomes with the dual probe, covalent binding of the probe to the target proteins promoted by UV irradiation, enrichment with streptavidin-conjugated beads, on-bead trypsin digestion, and multidimensional LC-MS/MS analysis of the resulting tryptic peptide mixture, where obtained mass spectra are screened against a human database (Fig. 5).

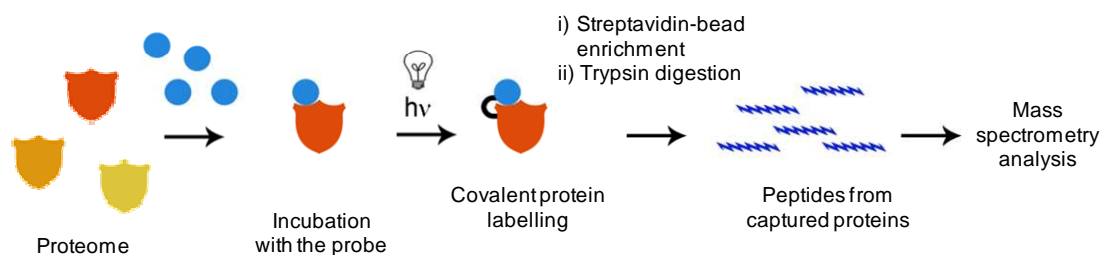


Figure 5. Scheme of the chemical proteomic platform.

Hence, we have conceived the design of dual probes based on our potent 5-HT_{1A}R ligand **1** ($K_i = 2.4$ nM) in which biotin and benzophenone moieties have been introduced (Fig. 6). We have considered again two options in the design of dual probes. Thus, we explored the possibility of attaching the biotin to the bridgehead carbon of the bicyclohydantoin, whereas the naphthalene ring was replaced by benzophenone in compound **61**. Alternatively, we have designed different dual tags containing both benzophenone and biotin that can be incorporated into the bridgehead carbon of the bicyclohydantoin through an alkyl chain as a linker (**62-65**). The obtained results show that in general, the introduction of a dual tag in the bicyclohydantoin (**62-65**) is more favorable in terms of affinity than the replacement of the aromatic moiety by benzophenone (**61**). Among the synthesized labelled compounds, **64** stands out as the highest-affinity compound ($K_i = 1.1$ nM, Fig. 6).

Before setting up the proteomic platform, it was necessary to confirm that the compounds were actually able to label proteins specifically. Hence we developed equivalent fluorescent probes to visualize the labelling using SDS-PAGE gel analysis. As a representative example, fluorescent compound **83** ($K_i = 22$ nM), in which lissamine has been introduced in place of the biotin moiety (Fig. 7) was used to confirm that these probes are able to label proteins in an UV irradiation-dependent manner indicating non-covalent binding events, as expected for GPCR ligands (Fig. 7A). In addition, the intensity of the labelling was concentration-dependent (Fig. 7B) and this binding could be displaced by an excess of the high-affinity parent ligand **1** (Fig. 7C).

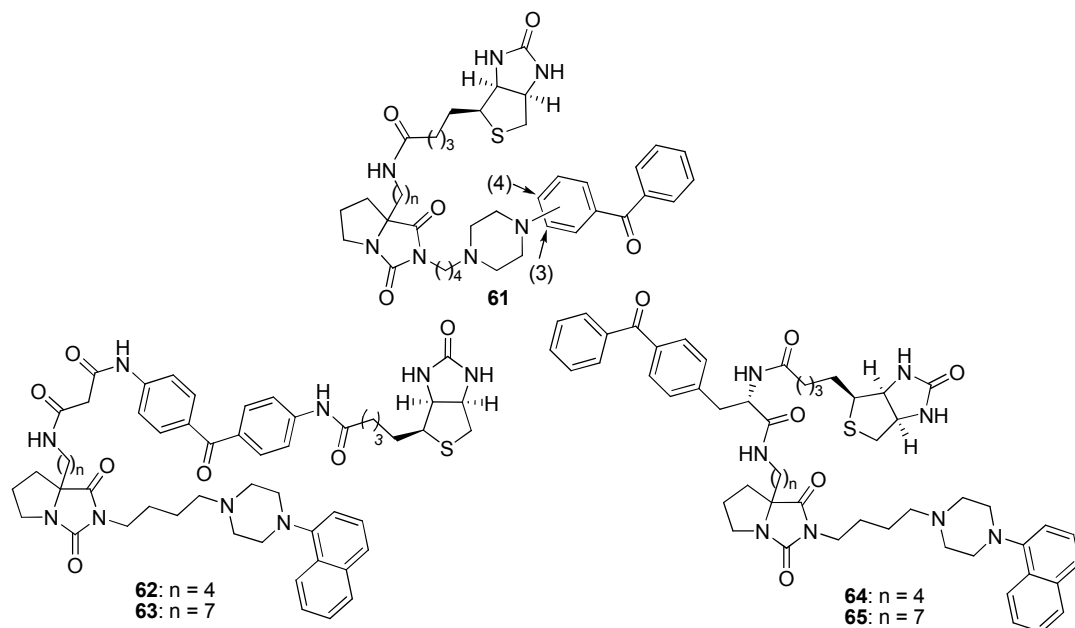


Figure 6. Design of GPCR dual probes to perform a proteomic platform.

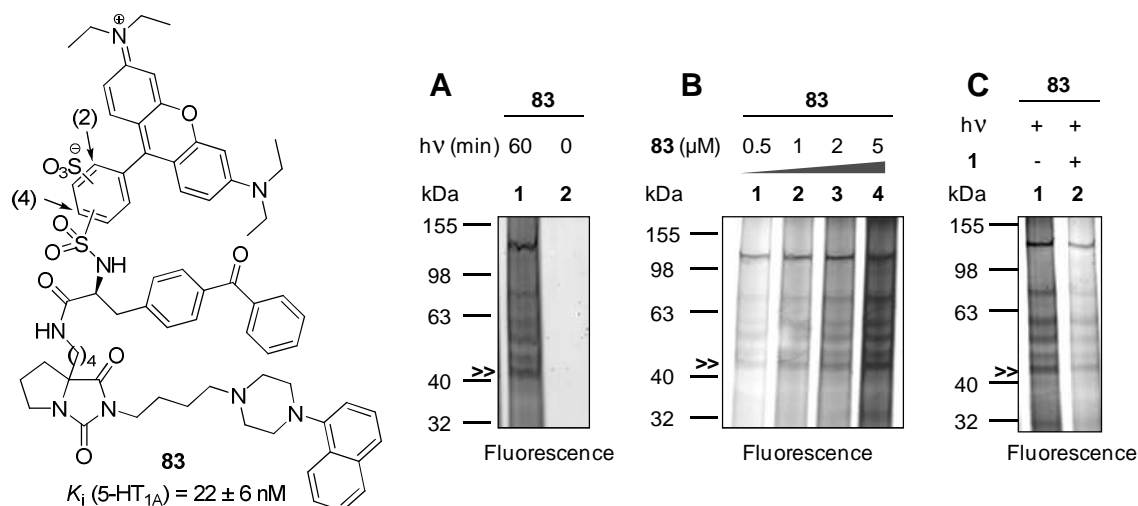


Figure 7. SDS-PAGE analysis of membranes HEK-293-EBNA transfected with the h5-HT_{1A}R, with dual probe **83**. (A) Irradiation-dependent labelling of membranes with the probe. (B) Concentration-dependent labelling of membranes. (C) Competition of probe with an excess of the 5-HT_{1A}R high-affinity ligand **1**.

In order to characterize the ligand-binding proteins, the high-affinity dual probe **64** ($K_i = 1.1$ nM, Fig. 6) was used in the chemical proteomic platform based on biotin-streptavidin affinity, followed by LC-MS/MS (Fig. 5). We initially used membranes HEK-293-EBNA transfected with the human 5-HT_{1A}R as the proteome. This model system enables the identification of the original target of the probe, thus providing a proof of concept of the approach. Accordingly, membrane homogenates were treated with the probe and irradiated with UV light. In order to distinguish the proteins that specifically interact with the probe, multiple

control samples were also carried out in parallel, including proteomes treated with the probe in the presence of an excess of the non-labelled ligand **1** as competitor, and proteomes to which no probe was added. Remarkably, probe **64** was able to capture the 5-HT_{1A}R as well as additional targets of the corresponding parent ligand **1**. These results support the solidness of the proteomic platform and the potential of these probes to interrogate biological systems regarding the existence of off-targets. Among the identified proteins it is interesting to note the presence of several members of the heat shock protein (HSP) family, in particular, Hsp60, Hsp70, and Hsp75. Considering that the HSP family of proteins has been the focus of a growing attention given their potential as antitumor targets,¹² it is quite interesting to confirm whether they are actual targets of the probes. Thus, we have performed SDS-PAGE analysis with pure Hsp60 and the fluorescent dual probe **83**. Our results show that Hsp60 is recognized by the probe **83** and this binding is abolished in the presence of an excess of the non-labelled ligand **1** (Fig. 8). In addition, to fully explore the versatility of the approach, clickable probe **84** ($K_i = 5$ nM, Fig. 8) was used and, after copper-catalyzed cycloaddition with the rhodamine-biotin-azide derivative TriN₃, similar results were obtained.

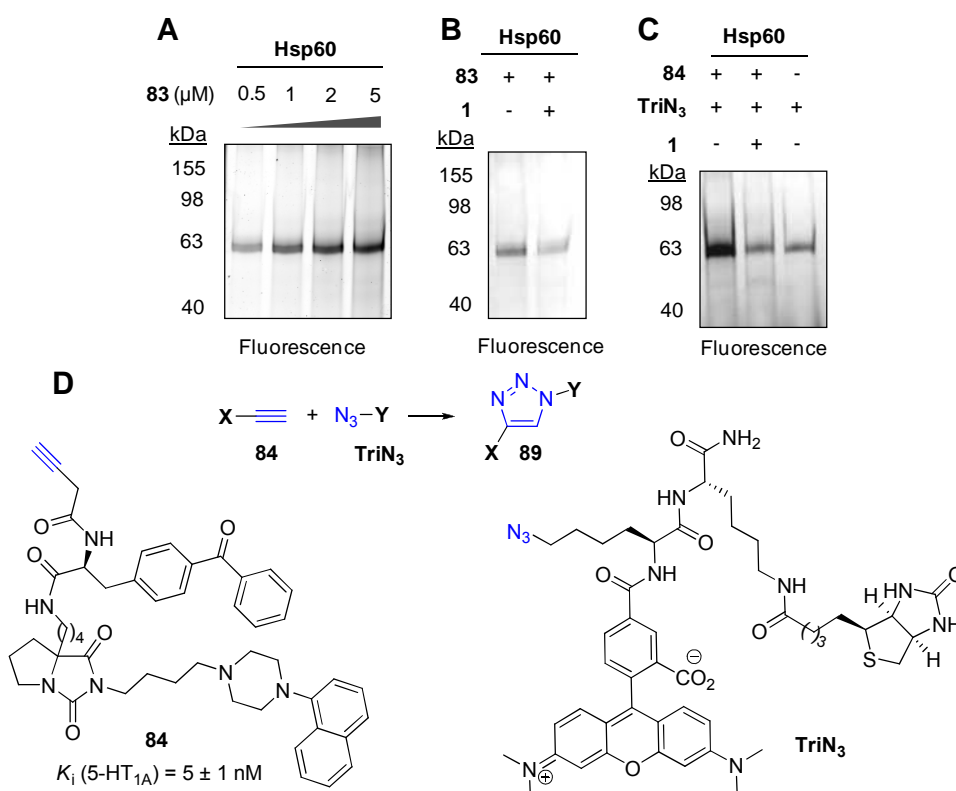


Figure 8. (A) Concentration-dependent labelling of pure Hsp60 with the probe **83**. (B) Competition of probe **83** with an excess of the 5-HT_{1A}R high-affinity ligand **1**. (C) Labelling of pure Hsp60 with the probe **84**. Competition of probe **84** with an excess of the 5-HT_{1A}R high-affinity ligand **1**. Non-specific signal in absence of the probe. (D) Copper-catalyzed click chemistry reaction between the probe **84** and TriN₃.

Together, these results support that the described dual probes are able not only to capture the 5-HT_{1A}R, but also can aid the identification of additional targets of the ligand. This possibility opens new avenues regarding the detection of potential liabilities of the compound, if the identified targets are related with the appearance of non-desired effects; or conversely, it can help the discovery of new targets of a given compound and, accordingly, lead to novel therapeutic indications. For instance, our results support that the analyzed serotonergic ligands can interact with HSP proteins. However, the role of 5-HT receptors or their ligands in cancer has just started to be examined. In this regard, recent studies show that the marketed antitumor drug sorafenib (Nexavar®), a known kinase inhibitor, has affinity for 5-HT receptors,¹⁴ and that the 5-HT_{1A}R plays a role in cancer.¹² Furthermore, the existence of inverse cancer comorbidity in people with certain central nervous system (CNS) disorders is under current analysis.¹⁵ This scenario suggests that the role of serotonin system could be easily go beyond the CNS and that this potential can be unveiled with the use of probes such as the ones described in this work.

4. CONCLUSIONS

The synthesized compounds described herein represent, to the best of our knowledge, the first efficacious chemical probes targeting the serotonin 5-HT_{1A}R. On the one hand, fluorescent probe **9** and biotin derivative **17** have enabled the visualization of the receptor in transfected cells; furthermore **19** has been successfully used to visualize this receptor in rat hippocampus neurons. On the other hand, dual probes **64**, **83**, and **84** have been used to set up a proteomic platform aimed at the identification of off-targets of 5-HT_{1A}R ligands. These strategies should contribute to the therapeutic exploitation of known or new members of the GPCR superfamily by providing valuable information about their location or level of expression. The optimization of this chemical technology in native and living systems should provide key insights towards the understanding of complex biological systems and aid the identification of new targets to treat unmet pathologies.

5. BIBLIOGRAPHY

1. Venkatakrishnan, A. J. *et al. Nature* **2013**, *494*, 185-194.
2. Moellering, R. E. *et al. Chem. Biol.* **2012**, *19*, 11-22.
3. Heal, W. P. *et al. Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 246-257.
4. Shannon, D. A. *et al. ChemBioChem.* **2012**, *13*, 2327-2330.
5. Lacivita, E. *et al. Expert Opin. Ther. Pat.* **2012**, *22*, 887-902.
6. Valhondo, M. *et al. J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7851-7861.
7. Marco, I. *et al. J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7986-7999.
8. López-Rodríguez, M. L. *et al. J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2548-2558.
9. López-Rodríguez, M. L. *et al. J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4439-4450.

10. López-Rodríguez, M. L. *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 1551-1557.
11. Alonso, D. *et al. ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 249-253.
12. Fiorino, F. *et al. J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4407-4426.
13. Speers, A. E. *et al. Chem. Biol.* **2004**, *11*, 535-546.
14. Lin, X. *et al. J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5749-5759.
15. Tabares-Seisdedos, R. *et al. Nat. Rev. Neurosci.* **2013**, *14*, 293-304.